



# MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

ECOLE DOCTORALE « SCIENCES DE LA NATURE ET DE L'HOMME » (ED 227)

## THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

Discipline : écotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Wilfried SANCHEZ**

**le, 06 septembre 2007**

**APPROCHE MULTI-BIOMARQUEURS CHEZ L'EPINOCHÉ À TROIS  
ÉPINES (GASTEROSTEUS ACULEATUS L.) : UN MODÈLE POUR LA  
SURVEILLANCE DES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES CONTINENTAUX**

Sous la direction du : Dr Philippe GARRIGUES

### JURY

Président	Pr. Jean PRYGIEL, Université de Lille, Agence de l'eau Artois-Picardie, Douai, France
Rapporteurs	Pr. Patrick KESTEMONT, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, Namur, Belgique Pr. Christophe MINIER, Université du Havre, Le Havre, France
Examineurs	Pr. Daniel GILLET, CEA, Gif-sur-Yvette, France Dr. Ioanna KATSIADAKI, CEFAS, Weymouth, Royaume-Uni Dr. Jean-Marc PORCHER, INERIS, Verneuil en Halatte, France
Directeur de thèse	Dr. Philippe GARRIGUES, Université de Bordeaux, Talence, France



## Remerciements

*Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS). Elle a bénéficié du soutien financier du Budget Civil de Recherche et Développement (BCRD04-DRC03) et du programme "Evaluation et Réduction des Risques liés à l'Utilisation des Pesticides" du Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement Durable.*

*Avant toute chose, je tiens à remercier Jean-Marc Porcher de m'avoir accueilli au sein de son équipe mais également pour la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de ces trois années puis en me proposant de poursuivre l'aventure dans son laboratoire. Je remercie aussi Philippe Garrigues d'avoir accepté la direction de cette thèse.*

*Je fais part de mes sincères remerciements à Patrick Kestemont et à Christophe Minier qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi qu'aux membres du jury : Ioanna Katsiadaki et Jean Prygiel.*

*Je fais également part de ma profonde reconnaissance aux membres du comité de pilotage de cette thèse : Marc Babut, Patrick Flammarion, Daniel Gillet et Eric Thybaud, qui ont accepté de suivre ce travail tout au long de son avancement et qui y ont incontestablement été bénéfiques.*

*J'adresse également mes remerciements au personnel de l'équipe recherche de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques :*

- *Sélim Aït-Aïssa qui a guidé mes premiers pas dans le monde des biomarqueurs et de l'épinoche et qui a su rester disponible malgré l'appel des cellules .*
- *François Brion, pour ses remarques constructives et sa précieuse aide dans le développement des méthodes immuno-enzymatiques.*
- *Olivier Palluel, grand maître du laboratoire de biochimie, pour m'avoir initié aux différents dosages et à la maîtrise de l'Olivier 3000 sans qui cette thèse ne serait pas encore terminée.*
- *Benjamin Piccini, pêcheur, éleveur de poissons et collocataire de bureau, pour sa précieuse aide dans la réalisation de ce travail et pour sa bonne humeur quotidienne.*

▪ *Nathalie Laville, Saïd Kinani et Marie-Estelle Gouze, doctorant ou post-doctorant de l'équipe mais également les stagiaires et plus particulièrement Carolyn Goin, Guillaume Buignet et Amandine Caudron qui ont chacun apporté leur pierre à l'édifice.*

*Je remercie également les différentes personnes rencontrées durant cette thèse et qui ont contribué, chacune à leur manière, à la réalisation de ce travail :*

▪ *Jean-Maxence Ditché mais aussi Allan Riffaud, Frédéric Villette de l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques qui ont contribué à l'élaboration et à la réalisation des campagnes de prélèvements des poissons sur le terrain.*

▪ *Laurent Lagadic, pour ses réponses à mes nombreuses questions concernant le programme « Changement d'échelle et évaluation du risque écotoxicologique de mélanges entre substances actives herbicides et adjuvant ».*

▪ *Marina Coquery, Laurent Meunier et Karine Tack de l'unité de chimie environnementale de l'INERIS pour la réalisation des dosages de métaux.*

▪ *Cheikh Diack pour les nombreuses conversations et les multiples conseils sur le traitement statistique des données.*

▪ *David Kingsley pour son invitation à participer au cours sur la biologie et la génomique chez l'épinoche à l'université de Stanford, une expérience des plus enrichissantes.*

*Enfin ces remerciements ne seraient être complets sans un mot pour les personnes qui ont accompagné mes premiers pas en écotoxicologie et qui sont incontestablement à l'origine de mon engagement dans cette voie : Alain Geffard, Jean-Claude Amiard et Claude Amiard-Triquet, un grand merci à vous.*

*Je terminerai par un clin d'œil spécial à Sophie Desmots et Nathalie Hinfrey, pour leur affection, leur écoute et leur bonne humeur qui m'ont été si précieuse pendant nos années de collocation.*

# Sommaire

<b>Sommaire .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abbréviations .....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des espèces .....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre 1 : Problématique et objectifs .....</b>	<b>9</b>
1.1. Problématique générale .....	9
1.2. Objectifs .....	11
1.3. Organisation du manuscrit.....	11
<b>Chapitre 2 : Justification des choix méthodologiques .....</b>	<b>15</b>
2.1. Approche multi-biomarqueurs .....	15
2.1.1. Biomarqueurs : définition, avantages et limites.....	15
2.1.2. Cibles biologiques et biomarqueurs.....	18
2.1.3. Vers une approche multi-biomarqueurs.....	33
2.2. Organisme choisi : l'épinoche à trois épines.....	37
2.3. Molécules utilisées .....	40
2.3.1. Les molécules modèles .....	40
2.3.2. Les contaminants environnementaux .....	40
2.4. Sites étudiés.....	45
2.4.1. Sélection des sites et échantillonnage .....	45
2.4.2. Description des sites.....	47
<b>Chapitre 3 : Mise en place méthodologique du travail.....</b>	<b>49</b>
3.1. Objectif.....	49
3.2. Adaptation des biomarqueurs chez l'épinoche.....	49
3.2.1. Principe et méthodologie .....	49
3.2.2. Résultats .....	51

3.3. Développement et validation de méthodes immuno-enzymatiques .....	51
3.3.1. Dosage de la vitellogénine .....	53
3.3.2. Dosage de la spiggin .....	56
3.4. Conclusion.....	57
<b>Chapitre 4 : Caractérisation de la réponse des biomarqueurs en conditions contrôlées.....</b>	<b>59</b>
4.1. Objectif et méthodologie.....	59
4.2. Résultats et discussion.....	61
4.2.1. Induction et inhibition des enzymes de biotransformation.....	61
4.2.2. Caractérisation des biomarqueurs du stress oxydant.....	65
4.2.3. Caractérisation de la réponse de l'acétylcholinestérase au fénitrothion .....	69
4.2.4. Inductibilité et sensibilité des marqueurs de la perturbation endocrinienne.....	71
4.3. Conclusion.....	73
<b>Chapitre 5 : Evaluation des biomarqueurs <i>in situ</i> .....</b>	<b>75</b>
5.1. Evaluation du potentiel de l'épinoche comme espèce sentinelle .....	75
5.1.1. Objectifs et méthodologie.....	75
5.1.2. Résultats et discussion.....	76
5.1.4. Conclusion.....	80
5.2. Etude de la variabilité naturelle des biomarqueurs.....	81
5.2.1. Objectif.....	81
5.2.2. Choix méthodologiques a priori.....	83
5.2.3. Résultats et discussion.....	83
5.2.4. Conclusion.....	89
5.3. Position d'une batterie de biomarqueurs par rapport à d'autres mesures chimiques et biologiques.....	91
5.3.1. Objectif.....	91
5.3.2. Résultats et discussion.....	91
5.3.3. Conclusion.....	95
<b>Chapitre 6 : Vers un outil de synthèse des données.....</b>	<b>97</b>
6.1. Objectif.....	97

<b>6.2. Principe et méthode de calcul.....</b>	<b>97</b>
6.2.1. <i>Loi normale et probabilité.....</i>	<i>97</i>
6.2.2. <i>Méthode de calcul .....</i>	<i>98</i>
<b>6.3. Résultats .....</b>	<b>101</b>
6.3.1. <i>Sélection de la ligne de base .....</i>	<i>101</i>
6.3.2. <i>Quel poids pour chaque biomarqueur ? .....</i>	<i>102</i>
6.3.3. <i>Dépendance de l'indice “ biomarqueurs ” par rapport à l'échantillonnage.....</i>	<i>103</i>
6.3.4. <i>Position de l'indice “ biomarqueurs ” par rapport à d'autres indices chimiques et écologiques .....</i>	<i>104</i>
<b>6.4. Discussion et conclusion.....</b>	<b>105</b>
<b>Chapitre 7 : Discussion générale.....</b>	<b>109</b>
<b>7.1. L'épinoche comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux aquatiques.</b>	<b>109</b>
7.1.1. <i>Un modèle pour l'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens ... ..</i>	<i>109</i>
7.1.2. <i>... et d'autres contaminants environnementaux.....</i>	<i>110</i>
7.1.3. <i>Du laboratoire au terrain, du terrain au laboratoire .....</i>	<i>111</i>
7.1.4. <i>Une distribution géographique favorable ? .....</i>	<i>112</i>
<b>7.2. Quelle place pour une batterie de biomarqueurs dans la stratégie de surveillance des milieux aquatiques ?.....</b>	<b>113</b>
7.2.1. <i>Validité des conditions de référence .....</i>	<i>113</i>
7.2.2. <i>Vers quelle utilisation d'une batterie de biomarqueurs.....</i>	<i>115</i>
7.2.3. <i>Un outil complémentaire.....</i>	<i>119</i>
7.2.4. <i>Vers le développement d'un indicateur environnemental spécifique.....</i>	<i>120</i>
<b>Chapitre 8 : Conclusion générale .....</b>	<b>123</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>127</b>





## Liste des abbréviations

<b>AChE</b> : Acétylcholinestérase	<b>HO<sup>•</sup></b> : Radical hydroxyde
<b>ACP</b> : Analyse en composantes principales	<b>HSI</b> : Indice hépatho-somatique
<b>AD</b> : Analyse discriminante	<b>HSP</b> : Protéines de choc thermique
<b>AhR</b> : Récepteurs des hydrocarbures aromatiques	<b>IB</b> : Indice “biomarqueurs”
<b>ALAT</b> : Alanine transaminase	<b>IBR</b> : Réponse Intégrée des Biomarqueurs
<b>AR</b> : Récepteur des androgènes	<b>INERIS</b> : Institut National de l’Environnement Industriel et des Risques
<b>ARE</b> : Élément de réponse aux androgènes	<b>IPR</b> : Indice Poisson Rivière
<b>ASAT</b> : Aspartate transaminase	<b>LD</b> : Limite de détection
<b>βNF</b> : β-naphtoflavone	<b>LQ</b> : Limite de quantification
<b>BSA</b> : Albumine sérique bovine	<b>17αMT</b> : 17α-méthyltestostérone
<b>CAT</b> : Catalase	<b>MT</b> : Métallothionéines
<b>CF</b> : Facteur de condition	<b>MXR</b> : protéines de résistance multi-xénobiotiques
<b>E2</b> : 17β-œstradiol	<b>NPEO</b> : Nonylphénols poly-éthoxylés
<b>EE2</b> : 17α-éthynyl- œstradiol	<b>NSI</b> : Indice néphro-somatique
<b>ER</b> : Récepteur des œstrogènes	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> : Oxygène singulet
<b>ERE</b> : Élément de réponse aux œstrogènes	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> : Anion superoxyde
<b>ERO</b> : Espèces réactives de l’oxygène	<b>Oxo<sup>8</sup>dG</b> : 7,8-dihydro-8oxo-2’désoxyguanosine
<b>EROD</b> : 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase	<b>PCB</b> : Polychlorobiphényle
<b>FapyGua</b> : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine	<b>SOD</b> : Superoxyde dismutase
<b>GPx</b> : Glutathion peroxydase	<b>SPG</b> : Spiggin
<b>GSH</b> : Glutathion total	<b>TBARS</b> : Substances réactives à l’acide thiobarbiturique
<b>GSI</b> : Indice gonado-somatique	<b>TBBP-A</b> : Tétrabromobisphénol-A
<b>GSSG</b> : Glutathion oxydé	<b>VTG</b> : Vitellogénine
<b>GST</b> : Glutathion-S-transferase	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : Peroxyde d’hydrogène	
<b>HAP</b> : Hydrocarbure aromatique polycyclique	

## Liste des espèces

Nom français	Nom latin	Nom anglais
Epinoche à trois épines	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Three-spined stickleback
Vairon à tête de boule	<i>Pimephales promelas</i>	Fathead minnow
Limande plie rouge	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Winter flounder
Spare doré	<i>Stenotomus chrysops</i>	Scup
Saumon de l'atlantique	<i>Salmon salar</i>	Atlantic salmon
Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Morue de l'atlantique	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic cod
Poisson rouge	<i>Carassius aurata</i>	Goldfish
Bar	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Sea bass
Goujon	<i>Gobio gobio</i>	Gudgeon
Chevaine	<i>Leuciscus cephalus</i>	European Chub
Poisson zèbre	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish
Carpe commune	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp
Anguille	<i>Anguilla anguilla</i>	European eel
Ganbusie	<i>Gambusia yucatana</i>	Ganbusia affinis
Truite fardée	<i>Oncorhynchus clarki</i>	Cutthroat trout
Sole marbrée	<i>Pleuronectes yokohamae</i>	Marbled flounder
Gardon	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
Perche	<i>Perca fluviatilis</i>	Perch
Mulet	<i>Mugil auratus</i>	Golden grey mullet
Dorade royale	<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream
Truite de rivière	<i>Salmo trutta fario</i>	Brown trout
Loche d'étang	<i>Misgurnus fossilis</i>	Weatherfish
Flet	<i>Platichthys flesus.</i>	Flounder
Loquette d'europe	<i>Zoarces viviparus</i>	Viviparous blenny
Chabot	<i>Cottus gobio</i>	Bullhead
Poisson chat	<i>Ameiurus nebulosus</i>	Brown bullhead

## Publications et communications

### PUBLICATIONS

**Sanchez W.**, Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. First approach of biomarker basal levels in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from low contaminated stream. *Environment International* (en préparation).

**Sanchez W.**, Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Multi-biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environment International* (soumise).

**Sanchez W.**, Goin C., Brion F., Olsson P.E., Goksøyr A., Porcher J.-M. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against a synthetic peptide. *Comparative Biochemistry et Physiology Part C: Toxicology et Pharmacology* (sous presse).

**Sanchez W.**, Piccini B., Porcher J.-M. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes et oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science et Health Part B: Pesticides, Food Contaminants et Agricultural Wastes* (sous presse).

**Sanchez W.**, Aït-Aïssa S., Ditché J.-M., Palluel O., Porcher J.-M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, **16**, 279-287.

**Sanchez W.**, Palluel O., Lagadic L., Aït-Aïssa S., Porcher J.-M. (2006). Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, diquat herbicide et their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Marine Environmental Research*, **62**, S29-S33.

**Sanchez W.**, Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. (2005). Copper-induced oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus aculeatus* L.) : relationship with hepatic copper et zinc levels. *Environmental Toxicology et Pharmacology*, **19**, 177-183.

Deviller G., Palluel O., Aliaume C., Asanthi H., **Sanchez W.**, Franco Nava M.A., Blancheton J.-P., Casellas C. (2005). Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response et trace metal accumulation. *Ecotoxicology et Environmental Safety*, **61**, 89-97.

### COMMUNICATIONS ORALES

**Sanchez W.**, Aït-Aïssa S., Ditché J.M., Katsiadaki I., Palluel O., Piccini B., Porcher J.M. Etude *in situ* de la réponse d'une batterie de biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) dans un contexte de biosurveillance. Colloque annuel de l'Association de Recherche en Toxicologie, Paris, Juin 2006.

**Sanchez W.**, Palluel O., Lagadic L., Cravedi J.P., Porcher J.M. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant et adjuvant herbicide mixtures on three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). 13<sup>th</sup> international symposium Pollutant Responses In Marine Organisms, Alessandria, June 2005.

## COMMUNICATIONS AFFICHEES

**Sanchez W.**, Gouze M.E., Kinani S., Goin C., Aït-Aïssa S., Porcher J.M. Environmental concentrations of cadmium modulate androgenic response of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). 17<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Porto, May 2007*.

**Sanchez W.**, Katsiadaki I., Piccini B., Gouze M.E., Aït-Aïssa S., Ditché J.M., Porcher J.M. Three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a valuable fish species to assess quality of freshwater ecosystems using a set of biochemical biomarkers. 17<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Porto, May 2007*.

**Sanchez W.**, Ditché J.M., Porcher J.M. Development of a specific biomarker-based index in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : a complementary tool for environmental biomonitoring. 17<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Porto, May 2007*.

**Sanchez W.**, Goin C., Goksøyr A. Porcher J.M. Development et validation of a competitive ELISA for three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin using antibodies against a synthetic peptide. 17<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Porto, May 2007*.

Lagadic L., Azam D., Coeurdassier M., Cossu-Leguille C., Coutellec M.-A., Cravedi J.-P., Denoyelles R., Giamberini L., Guerlet E., Heydorff M., Hillemweck A., Jaeg J.-P., Lefeuvre-Orfila L., Porcher, J.-M., Quemeneur A., **Sanchez W.**, Vasseur P., de Vauflery A. Changements d'échelle et évaluation du risque écotoxicologique de mélanges entre substances actives herbicides et adjuvant. Colloque "Pesticides : comment réduire les risques associés ?", *Avignon, Novembre 2005*.

**Sanchez W.**, Brion F., Nilsen B.M., Porcher J.-M. Assessment of estrogenic effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) using vitellogenin measurement by ELISA method. 15<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Lille, May 2005*.

**Sanchez W.**, Lamothe S., Palluel O., Ditché J.-M., Gomez E., Fenet H., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. Evaluation of three-spined stickleback hepatic EROD activity in laboratory et field studies. 15<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Lille, May 2005*.

**Sanchez W.**, Palluel O., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. *In situ* multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in agricultural area. 14<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Environmental Toxicology et Chemistry, *Prague, Avril 2004*.

**Sanchez W.**, Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. Effect of copper on oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus aculeatus* L.). 7<sup>th</sup> International Conference of the Aquatic Ecosystem Health et Management Society, *Lyon, Septembre 2003*.

# Chapitre 1 : Problématique et objectifs

## 1.1. PROBLEMATIQUE GENERALE

L'accroissement des contaminations inhérent au développement des activités humaines a fait apparaître la nécessité de surveiller la qualité de l'environnement. Récemment, la directive Européenne cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE, Conseil de la Communauté Européenne, 2000) mettait en place un cadre réglementaire pour la politique de l'eau au niveau communautaire afin d'améliorer, de protéger et de prévenir les dégradations de la qualité de l'eau en Europe. Dans son article 4, la directive fixe pour objectif de parvenir à un bon état écologique et chimique des eaux<sup>1</sup> d'ici à 2015. Pour ce faire, elle prévoit l'établissement, par les Etats membres et les pays candidats à l'adhésion, de programmes de surveillance<sup>2</sup> de la qualité des eaux portant sur des paramètres physico-chimiques, chimiques, biologiques et hydro-morphologiques, afin de dresser un tableau cohérent et complet de l'état des eaux en Europe. Afin de mettre en œuvre ces programmes de surveillance, différentes méthodologies sont applicables parmi lesquelles, certaines sont déjà utilisées, en France et en Europe, dans des réseaux pérennes nationaux. C'est le cas,

- Des méthodes chimiques qui permettent de quantifier, avec une sensibilité et une précision toujours plus importante, les contaminants au sein de différentes matrices environnementales. Ces méthodes analytiques renseignent sur la contamination de l'environnement par les seules substances recherchées mais en aucun cas sur la biodisponibilité des polluants ou sur l'impact de cette contamination au niveau des organismes et des populations (Amiard et al., 1998) ;

- Des approches biologiques basées sur l'occurrence et l'abondance d'espèces bioindicatrices parmi lesquelles figurent les diatomées (Prygiel, 2002), les oligochètes (Prygiel et al., 1999) ou encore les poissons (Oberdorff et al., 2002). A l'instar des variables chimiques, ces méthodes biologiques intègrent les nombreuses sources de variabilité liées à la contamination (composition, débit, rythme d'évacuation) mais aussi au milieu (perturbations

---

<sup>1</sup> Les objectifs de la directive Européenne cadre sur l'eau sont établis aussi bien pour les eaux de surface que pour les eaux souterraines ou côtières.

<sup>2</sup> Trois types de programmes de surveillance sont prévus par la directive avec des contrôles de surveillance (suivi à long terme des changements de la qualité de l'eau), des contrôles opérationnels (recueil de données sur les masses d'eau à risque) et des contrôles d'enquête (recherche des causes de dégradation de la qualité des eaux).

physiques, prolifération d'espèces indigènes ou exotiques). Elles permettent ainsi de diagnostiquer la qualité de l'eau ou des biocénoses<sup>3</sup>. Malgré leur pertinence écologique, ces méthodes ne peuvent refléter qu'une dégradation *a posteriori* et souffrent d'un manque de prédictivité.

En complément de ces méthodes conventionnelles, d'autres approches basées sur les mécanismes d'action des polluants permettent l'évaluation de l'exposition et/ou de l'impact de la contamination sur les organismes. Ces méthodes (*e.g.* modèles cellulaires, bio-essais et biomarqueurs), permettent de rendre compte des effets potentiels sur les individus (Allan et al., 2006; Brack et al., 2007). Même si elles ne permettent pas l'identification formelle des substances responsables, elles pourraient trouver une place intermédiaire entre l'analyse chimique des milieux et l'évaluation des perturbations populationnelles.

Les biomarqueurs sont définis comme des changements observables et/ou mesurables au niveau biochimique, physiologique, histologique, morphologique ou comportemental qui révèlent l'exposition présente ou passée à au moins une substance à caractère polluant (Lagadic et al., 1997a). Ils constituent un signal précoce d'effet de la contamination sur les organismes et en conséquence, ils sont plus sensibles que les paramètres mesurés à un niveau supérieur d'organisation biologique tel que l'individu ou la population. Un biomarqueur unique ne permet pas de rendre compte de l'ensemble des contaminants présents dans les écosystèmes et susceptibles de perturber l'état de santé des organismes qui y vivent. Afin de prendre en compte la grande diversité des contaminants et la multiplicité de leurs effets, il est apparu nécessaire de recourir à une approche multi-biomarqueurs basée sur la mesure de plusieurs biomarqueurs complémentaires (Blaise et al., 2002; Galloway et al., 2004a). Dans ce contexte, les données issues des études environnementales sont nombreuses et leur interprétation s'avère souvent complexe pour les non-spécialistes. Des travaux récents ont montré l'intérêt de développer des "indicateurs écotoxicologiques", basés sur la réponse des biomarqueurs, qui puissent rendre compte de l'état de perturbation des organismes et facilitent la discrimination des sites d'étude (Beliaeff et Burgeot, 2002; Broeg et al., 2005). Toutefois, un effort important doit encore être fait afin de mener à bien la caractérisation et la validation nécessaires à l'utilisation des biomarqueurs comme outils de surveillance de la qualité des milieux aquatiques.

---

<sup>3</sup> Seules les méthodes s'appuyant sur le principe d'écart à la référence permettent l'évaluation de la qualité des biocénoses à l'image de l'Indice Poisson Rivière (IPR) (Prygiel, 2003).

## 1.2. OBJECTIFS

Cette thèse s'intègre dans une stratégie plus globale sur l'utilisation des biomarqueurs dans un contexte de multi-pollution. Plus spécifiquement, elle a pour objectifs 1) d'évaluer le potentiel de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) comme espèce sentinelle utilisable pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau, et 2) de déterminer, chez cette espèce, les conditions et les limites d'utilisation d'une batterie de biomarqueurs dans un contexte de multi-pollution.

L'atteinte de ces objectifs passe par :

- L'optimisation de différents dosages de biomarqueurs chez l'épinoche mais également, la mise en place et la validation de méthodes de dosages immuno-enzymatiques spécifiques de la perturbation endocrinienne ;
- L'évaluation, en conditions contrôlées, de la réponse des différents biomarqueurs sélectionnés à l'aide de substances de référence et/ou de contaminants environnementaux ;
- La caractérisation, en terme de valeurs basales et de niveaux de réponse, d'un ensemble cohérent de biomarqueurs chez des épinoches échantillonnées *in situ* ;
- La confrontation des mesures de biomarqueurs à d'autres données environnementales telles que des données qualitatives et/ou quantitatives sur la contamination du milieu, mais aussi des mesures populationnelles visant à évaluer les effets de la contamination de l'environnement au niveau des populations et des communautés.

## 1.3. ORGANISATION DU MANUSCRIT

Suite à la présentation de la problématique générale et des objectifs de cette thèse, le **second chapitre** du manuscrit s'attache à décrire et à justifier les choix méthodologiques effectués dans le cadre de ce travail. L'approche multi-biomarqueurs mise en œuvre et le modèle biologique utilisé sont présentés dans cette partie au côté des différentes substances et des sites d'échantillonnage étudiés dans ce travail.

Les chapitres suivants présentent les différents résultats acquis au cours de ce travail. Les publications qui en résultent sont rassemblées en annexe. Aussi, dans le corps du texte, les résultats sont synthétisés afin de ne pas reprendre dans le détail les informations se trouvant dans les articles mais au contraire de les compléter.



Le **troisième chapitre** présente la mise en place méthodologique du travail avec d'une part l'optimisation des dosages de biomarqueurs chez l'épinoche et d'autre part, le développement et la validation de deux dosages immuno-enzymatiques de type ELISA compétitif spécifiques de la vitellogénine et de la spiggin. Ce dernier est présenté dans l'article 1<sup>4</sup>.

Le **quatrième chapitre** détaille les données obtenues sur la caractérisation des cinétiques de réponse des biomarqueurs, en conditions contrôlées, suite à des expositions à des molécules de référence et/ou à des contaminants environnementaux. Ce chapitre qui se réfère à de nombreux résultats non publiés, s'appuie également sur trois publications.

- Les articles 2<sup>5</sup> et 3<sup>6</sup> présentent les cinétiques de réponses des enzymes de biotransformation et des paramètres antioxydants respectivement suite à une exposition à différentes concentrations de sulfate de cuivre et de prochloraz. Dans l'article 3, un effort particulier est porté sur l'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase.

- L'article 4<sup>7</sup> est le fruit d'un travail plus large sur les mélanges entre herbicide et adjuvant. Dans cette publication, les réponses des enzymes de biotransformation, des paramètres antioxydant et de la vitellogénine, chez des poissons exposés à un herbicide, son adjuvant et leur mélange, sont présentées.

Le **cinquième chapitre** rassemble les résultats acquis *in situ* qui concourent à la validation de l'épinoche à trois épines comme espèce sentinelle utilisable pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux à l'aide d'un ensemble de paramètres biochimiques. Ce chapitre se divise en trois parties aux objectifs distincts.

- La première partie qui est présentée dans l'article 5<sup>8</sup> étudie la faisabilité d'une approche multi-biomarqueurs chez des épinoches prélevées *in situ*. Il confirme l'intérêt d'une

---

<sup>4</sup> Sanchez W., Goin C., Brion F., Olsson P.E., Goksøyr A., Porcher J.-M. Development et validation of an ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against a synthetic peptide. *Comparative Biochemistry et Physiology Part C: Toxicology et Pharmacology* (soumise).

<sup>5</sup> Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. (2005). Copper-induced oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : relationship with hepatic copper et zinc levels. *Environmental Toxicology et Pharmacology*, **19**, 177-183.

<sup>6</sup> Sanchez W., Piccini B., Porcher J.-M. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes et oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science et Health Part B: Pesticides, Food Contaminants et Agricultural Wastes* (soumise).

<sup>7</sup> Sanchez W., Palluel O., Lagadic L., Aït-Aïssa S., Porcher J.-M. (2006). Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, diquat herbicide et their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Marine Environmental Research*, **62**, S29-S33.

<sup>8</sup> Sanchez W., Aït-Aïssa S., Ditché J.-M., Palluel O., Porcher J.-M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, **16**, 279-287.



telle approche pour la discrimination des sites d'étude et apporte une première information sur l'effet de certains facteurs biotiques et abiotiques sur la réponse des biomarqueurs.

- La seconde partie propose, à partir de poissons provenant d'un site dit de référence situé dans notre zone d'étude, d'établir un jeu de valeurs basales pour les biomarqueurs étudiés dans ce travail et d'en déterminer la variabilité saisonnière en lien avec des facteurs physiologiques et/ou environnementaux.

- La dernière partie qui est présentée dans l'article 6<sup>9</sup> s'intéresse à la réponse d'un ensemble de biomarqueurs mesurés chez des épinoches échantillonnées dans différents cours d'eau et s'attache à positionner les biomarqueurs par rapport à d'autres données informatives sur la contamination des écosystèmes. Cette publication permet de mettre en avant la complémentarité entre les approches chimiques, biochimiques et populationnelles.

Le **sixième chapitre** présente le développement et l'évaluation d'un outil de traitement des données permettant de synthétiser la réponse d'une batterie de biomarqueurs mesurée chez l'épinoche.

Enfin, une discussion générale des résultats ainsi que les perspectives qui en découlent seront présentées avant qu'une conclusion générale sur ce travail clôture le manuscrit.

---

<sup>9</sup> Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Multi-biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environmental Pollution* (en préparation).



## Chapitre 2 : Justification des choix méthodologiques

### 2.1. APPROCHE MULTI-BIOMARQUEURS

#### 2.1.1. Biomarqueurs : définition, avantages et limites

##### 2.1.1.1. Présentation générale

Les biomarqueurs ont fait leur apparition en écotoxicologie au cours des années quatre-vingts. Initialement décrit comme la réponse d'une structure ou d'une fonction biochimique ou physiologique "normale" à la présence d'un xénobiotique, la multiplication des travaux scientifiques autour de cette thématique a engendré de nombreuses définitions de la notion de biomarqueur (Huggett et al., 1992; National Research Council, 1987; Timbrell et al., 1994). Nous retiendrons ici celle énoncée par (Lagadic et al., 1997a) qui définissent un biomarqueur comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance à caractère polluant. Cette définition peut être complétée de plusieurs critères regroupant les informations importantes qui permettent d'évaluer les forces et les faiblesses de différents candidats biomarqueurs (Stegeman et al., 1992; Van der Oost et al., 2003).

- Les méthodes de mesure des biomarqueurs doivent être sensibles, précises et simples de mise en œuvre.
- La réponse des biomarqueurs doit être rapide afin de pouvoir être considérée comme un paramètre d'alerte précoce.
- Les niveaux constitutifs et leurs variations, dues aux effets de facteurs physiologiques ou environnementaux, doivent être définis afin de distinguer la réponse induite par un contaminant de la variabilité naturelle.
- Les mécanismes qui supportent la relation entre la réponse des biomarqueurs et l'exposition aux contaminants doivent être connus. De ce fait, la notion de biomarqueur est amenée à évoluer avec les connaissances scientifiques.

- La signification toxicologique des biomarqueurs, qui peut être décrite comme le lien entre la réponse biochimique et les effets sur les organismes, doit être connue.

Même s'il est classique de distinguer, derrière cette définition générale, des biomarqueurs d'exposition, des biomarqueurs d'effet et des biomarqueurs de susceptibilité (National Research Council, 1987), ces paramètres biologiques s'inscrivent dans un processus continu et complexe, allant de l'exposition aux polluants aux effets sur l'organisme et les populations. En conséquent, une telle terminologie reste arbitraire même s'il est possible, pour chaque marqueur, de mettre en avant une tendance vers l'une de ces catégories (Flammarion, 1997).

#### *2.1.1.2. Intérêt des biomarqueurs*

Lors du contact entre un organisme et un contaminant, les premiers événements mesurables ont lieu au niveau moléculaire par l'interaction du xénobiotique avec des molécules endogènes. En prenant en compte ces effets précoces, les biomarqueurs présentent une capacité de prévention qui n'est pas retrouvée avec les autres méthodes de surveillance de l'environnement, qu'elles soient chimiques ou biologiques. De plus, ces variables biologiques vont prendre en compte, dans leur réponse, la complexité physiologique des organismes en intégrant les effets positifs des systèmes de protection mais aussi les différentes interactions entre les contaminants et/ou les molécules endogènes (Lagadic et al., 1997a).

Les biomarqueurs présentent l'avantage d'une évaluation intégrée dans le temps de l'exposition ou de l'effet des polluants environnementaux biodisponibles, qu'ils s'agissent de molécules mères ou de produits de dégradation, seuls ou en mélanges. Ils restituent, à un instant donné, une image intégrative des variations qualitatives et quantitatives de la contamination. Ils sont de plus susceptibles de refléter l'exposition des organismes à des polluants rapidement métabolisables et peu accumulables. Les espèces supports sélectionnées pour l'étude de la réponse des biomarqueurs peuvent en fonction de leur habitat et de leur position dans le réseau trophique, fournir des informations sur la façon dont se comportent les polluants dans les écosystèmes (Lagadic et al., 1997a; Stegeman et al., 1992).

Les biomarqueurs présentent donc un caractère intégrateur important qui leur confère un indéniable avantage par rapport aux méthodes chimiques ou aux méthodes biologiques basées sur la bioindication classiquement mises en œuvre pour la surveillance des écosystèmes. Ils

permettent une évaluation géographique et temporelle de la contamination des milieux et des effets associés.

#### *2.1.1.3. Limites d'utilisation.*

La faculté des biomarqueurs à intégrer des facteurs environnementaux, toxicologiques et écologiques dans leur réponse est aussi source de complexité. En effet, ces différents facteurs vont générer un “ bruit de fond ” susceptible de masquer le signal d’une perturbation causée par des polluants. Il apparaît donc nécessaire, pour une interprétation correcte des informations fournies par les biomarqueurs, de distinguer de ce “ bruit de fond ”, la réponse induite par un polluant (McCarthy, 1990).

L’intérêt de la mesure des biomarqueurs a toutefois été montré dans le cas d’études amont-aval ou de profil de rivière. Ces approches basées sur la comparaison de la réponse des biomarqueurs par rapport à un site situé en amont peuvent être considérées comme restrictives par rapport au fort potentiel des biomarqueurs (Flammarion, 1997). Il apparaît donc nécessaire de s’affranchir de cette contrainte pour une application plus large des biomarqueurs dans un contexte de surveillance des écosystèmes. Cela revient donc à généraliser la connaissance relative des biomarqueurs acquise jusqu’à présent pour déterminer des plages naturelles de variations qui seraient valables pour un ou plusieurs bassins hydrographiques. Cette démarche rendra plus sûre l’interprétation des réponses en diminuant les risques de faux positifs ou de faux négatifs liés, en particulier, aux interactions entre substances (Mayer et al., 1992).

Un autre des facteurs limitant l’utilisation des biomarqueurs pour la surveillance des milieux est l’absence de preuve directe de leur prédictivité (Monod, 1997). Les biomarqueurs sont en effet des outils spécifiques et précoces. Or, quand on gagne en spécificité, en sensibilité et en précision, on risque de perdre en pertinence écologique (Figure 2-1). Ainsi, il n’existe que peu de données quant à la relation entre la réponse biochimique et les effets à long terme sur les organismes et les populations. De récents travaux de laboratoire menés chez le vairon à tête de boule (*Pimephales promelas*) ont toutefois permis d’établir un lien entre l’exposition à des composés androgéniques et anti-androgéniques, l’inhibition de la synthèse de vitellogénine et la fécondité des poissons (Miller et al., 2007), offrant ainsi de nouvelles perspectives en terme d’utilisation des biomarqueurs.

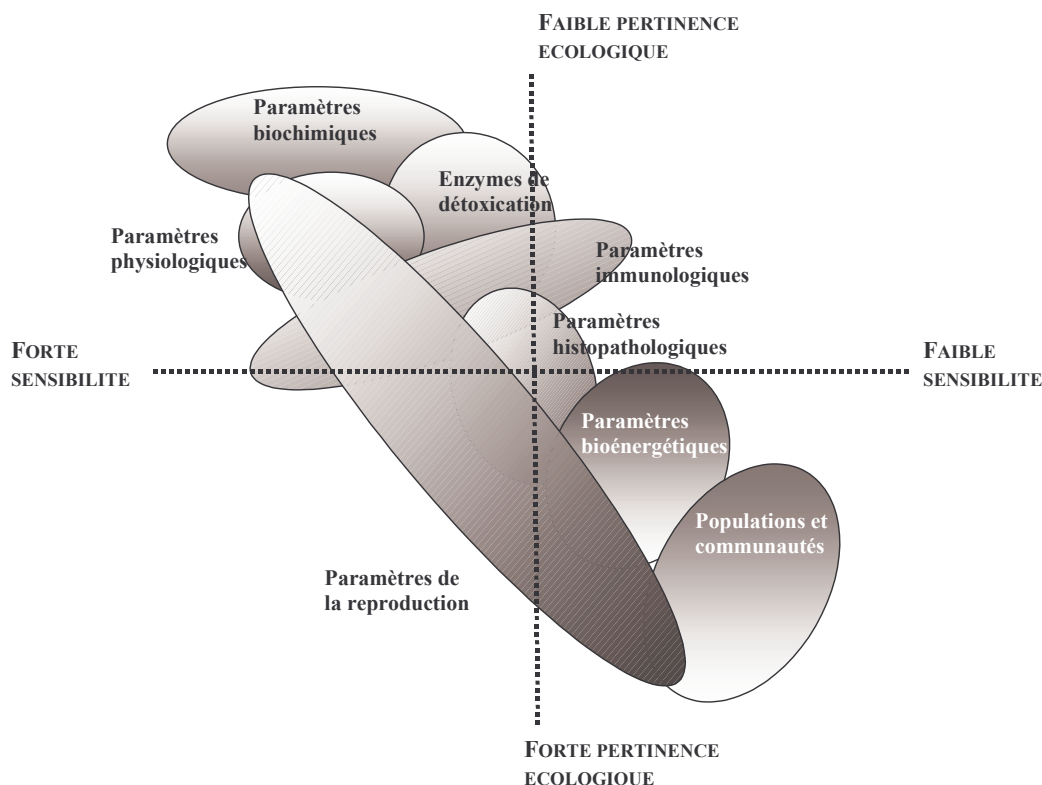


Figure 2-1 : Représentation théorique de la relation entre sensibilité aux contaminants et pertinence écologique pour différentes réponses de biomarqueurs. Adapté d'après Adams et al. (1989).

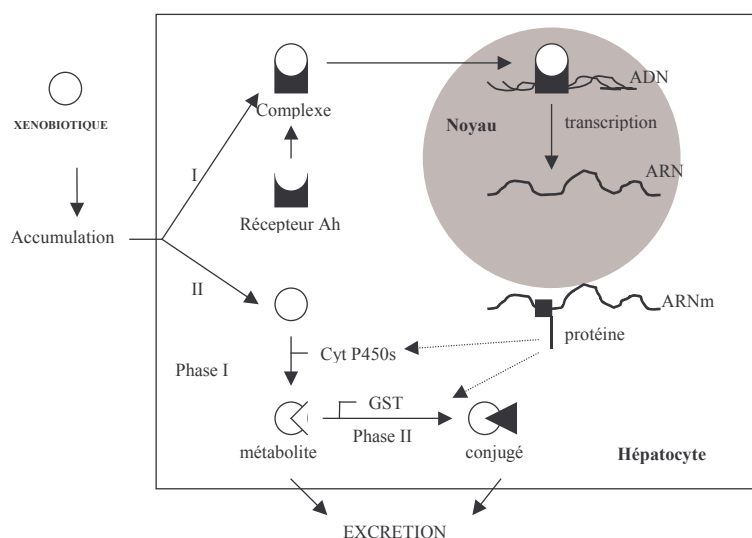
## 2.1.2. Cibles biologiques et biomarqueurs

### 2.1.2.1. Les enzymes de biotransformation

Suite à leur pénétration dans les organismes, les xénobiotiques à caractère hydrophobe subissent généralement une métabolisation, ou biotransformation, catalysée par différents systèmes enzymatiques (Figure 2-2). Ce processus biologique peut être envisagé de manière séquentielle avec une première phase, dite de fonctionnalisation, qui consiste en une oxydation rendant la molécule plus polaire. Ce mécanisme est majoritairement le fait des monooxygénases à fonctions multiples et plus particulièrement des complexes multi-enzymatiques dépendants du cytochrome P450. Au cours de cette première étape, les polluants peuvent subir une activation métabolique entraînant la formation de dérivés généralement électrophiles, plus toxiques que le produit initial et qui sont susceptibles de se lier aux macromolécules biologiques. Une seconde phase, dite de conjugaison, consiste en la fixation, sur les métabolites issus de la phase I, de molécules possédant des groupements

hydroxyles, sulfhydriles ou carboxyles afin d'accroître leur hydrosolubilité et de faciliter leur excrétion par l'urine ou par la bile.

Du fait de l'importance de la biotransformation des xénobiotiques dans la survie des organismes, plusieurs enzymes impliquées dans ce processus physiologique ont fait l'objet de nombreuses études et sont désormais des biomarqueurs reconnus.



**Figure 2-2 : Présentation simplifiée du devenir des xénobiotiques dans les hépatocytes. I : mécanisme possible pour l'induction des enzymes. II : mécanisme possible pour la détoxification des xénobiotiques (d'après Van der Oost et al. (1996).**

▪ L'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) est une activité catalytique du cytochrome P450 1A qui peut être induite suite à l'exposition des organismes à des xénobiotiques organiques, analogues structuraux de la dioxine. En effet, ces xénobiotiques vont se lier sur le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) et entraîner une cascade réactionnelle débouchant sur la synthèse *de novo* de nouvelles protéines P450 (Figure 2-2). Il en résulte alors une augmentation de l'activité enzymatique associée qui peut être mesurée au laboratoire au travers de la réaction de dééthylation de la 7 éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente (Di Giulio et al., 1993; Flammarion et al., 1998a; Machala et al., 1997). L'induction du cytochrome P450 1A s'avère être rapide, réversible et dépendante de la concentration en inducteurs. Les composés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et certains organochlorés, dont la structure permet la liaison au AhR sont donc les inducteurs privilégiés de l'activité EROD. D'autres xénobiotiques peuvent induire l'activité EROD sans fixation sur le AhR. C'est par

exemple le cas des imidazoles<sup>10</sup> (Babin et al., 2005; Bach et Snegaroff, 1989) mais l'induction qu'ils génèrent reste faible et transitoire comparativement à celle provoquée par les ligands du AhR. Certains contaminants environnementaux sont aussi des inhibiteurs de l'activité EROD qui vont interagir avec l'enzyme, diminuant ainsi l'activité catalytique, ou exercer une toxicité non spécifique (diminution de la synthèse des protéines, de l'hème...). Parmi les inhibiteurs connus de l'activité EROD figurent certains métaux lourds tels que le cadmium ou le cuivre (Flammarion et al., 1996; Stien et al., 1997), les pesticides organophosphorés (Flammarion et al., 1998b) et certains agonistes du récepteur des œstrogènes (ER)(Anderson et al., 1996; Hasselberg et al., 2004b; Vaccaro et al., 2005). De plus, à fortes doses, certains inducteurs comme la  $\beta$ -naphtoflavone, peuvent aussi inhiber l'activité EROD (Flammarion et al., 1999).

La forte spécificité de cette enzyme pour les ligands du AhR fait apparaître la mesure de l'activité EROD comme un biomarqueur pertinent pour évaluer l'exposition des organismes à ces différents contaminants. Aussi, les nombreuses données accumulées sur ce biomarqueur, aussi bien au laboratoire que sur le terrain, contribuent à en faire le biomarqueur le mieux documenté et rendent possible son utilisation à grande échelle dans des programmes de surveillance de l'environnement. L'activité EROD est en effet utilisée en routine dans le cadre du programme BEST<sup>11</sup> qui évalue la qualité chimique et biologique des grands fleuves américains en couplant dosage de contaminants dans le milieu et dans les organismes et mesure de paramètres biochimiques (Hinck et al., 2007; Hinck et al., 2006; Schmitt et al., 2005).

▪ La **glutathion-S-transferase** (GST) est une enzyme de phase II qui catalyse, dans le cytosol, la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère électrophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire qui est le glutathion (Habig et al., 1974). L'addition se fait soit directement sur les groupements fonctionnels du xénobiotique et dans ce cas, la molécule est directement métabolisée par la GST, soit, lorsque la molécule ne possède pas de fonction qui permette cette réaction, sur les groupements hydrophiles générés par l'action préalable des monooxygénases à cytochrome P450. La GST joue donc un rôle majeur dans la neutralisation et la détoxification de certains xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité et en facilitant ainsi leur élimination (Figure 2-2)(Van der Oost et al., 2003). La GST participe également au transport intracellulaire de certains composés comme les

---

<sup>10</sup> Le prochloraz, le clotrimazole, le propiconazole ou le kétoconazole sont des molécules de la famille des imidazoles.

<sup>11</sup> BEST : "Biomonitoring of Environmental Status et Trends" est un programme de surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux piloté par le service d'étude géologique des Etats-Unis.



hèmes, la bilirubine et les acides biliaires. Elle est aussi impliquée dans la biosynthèse des leucotriènes et des prostaglandines. En marge de la GST cytosolique qui est impliquée dans la détoxification des composés électrophiles, il a été mis en évidence l'existence d'une forme membranaire de la GST. Cette isoenzyme qui est activée par les espèces réactives de l'oxygène que sont le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde, participe à la protection cellulaire vis à vis des dommages induits par des molécules oxydantes (Aniya et Anders, 1989). La GST microsomale participe également à la détoxification des produits réactifs issus de la lipoperoxydation (Berhane et al., 1994). Il a été mis en évidence, chez des truites exposées à des polluants modèles, l'existence d'une corrélation négative entre l'activité de la GST cytosolique et celle de la GST membranaire. Ce résultat pourrait alors être expliqué par l'inhibition de la GST cytosolique suite à un stress oxydant qui augmente l'activité de la GST membranaire (Petrivalsky et al., 1997).

#### *2.1.2.2. Les paramètres du stress oxydant*

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et les systèmes pro-oxydants, en faveur de ces derniers, impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et source d'effets toxiques potentiels (Sies, 1991). Dans les systèmes biologiques, les ERO sont produites continuellement suite à des réductions électroniques de l'oxygène moléculaire, qui peuvent être univalentes, divalentes ou trivalentes<sup>12</sup> et qui impliquent des molécules endogènes et/ou des xénobiotiques (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les espèces radicalaires sont, en effet, des intermédiaires réactionnels dans de nombreuses réactions métaboliques telles que la respiration cellulaire ou la phagocytose. De plus, des enzymes clés du métabolisme produisent des oxyradicaux. C'est le cas de certaines enzymes impliquées dans la synthèse des acides aminés et des prostaglandines, mais aussi des monooxygénases associées au cytochrome P450. De nombreux xénobiotiques peuvent également induire la production d'ERO en se comportant comme des systèmes redox qui, une fois réduits, peuvent transférer un électron sur l'oxygène pour former un anion superoxyde  $O_2^-$ <sup>13</sup> (Kappus, 1987).

---

<sup>12</sup> Elles génèrent respectivement l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyde ( $HO^\bullet$ ).

<sup>13</sup> Parmi ces substances figurent les dérivés de structure quinonique, les dérivés aromatiques, nitroaromatiques et hydroxylaminés, les diazoïques et les métaux de transition (Kappus, 1987).

En raison de leur importante implication dans les processus physiologiques mais également des dommages qu'elle est susceptible de générer, la production d'ERO doit être étroitement contrôlée. Pour ce faire, les organismes ont développé des mécanismes d'action antioxydante qui s'appuient sur des systèmes enzymatiques ou non enzymatiques, afin d'éliminer les ERO et d'augmenter les activités de réparation et/ou d'élimination des molécules endommagées.

Les antioxydants enzymatiques sont représentés par trois enzymes majeures qui agissent de manière coordonnée afin d'éliminer les ERO (Figure 2-3).

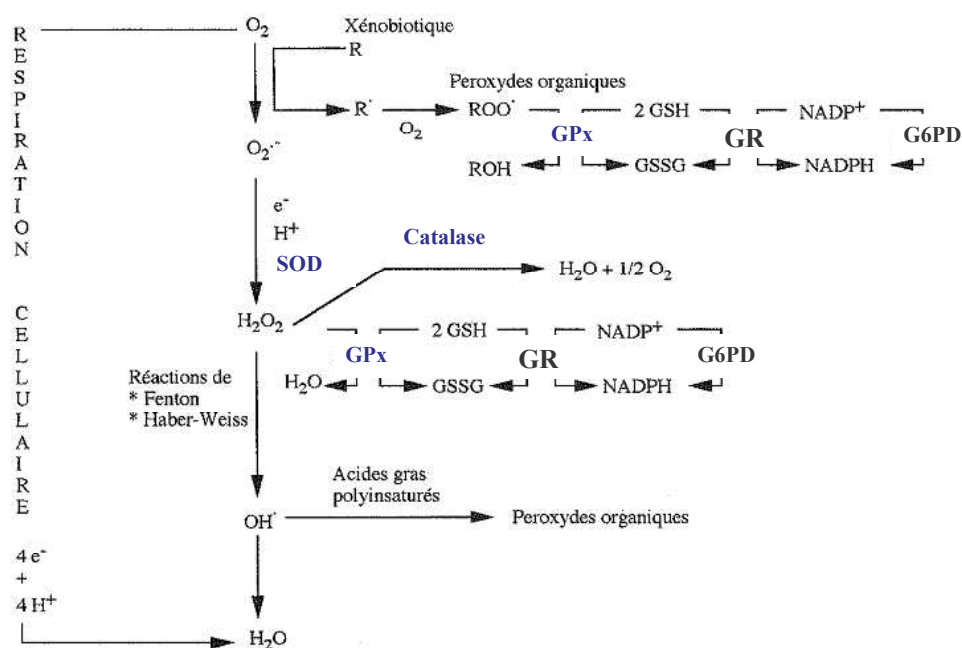


Figure 2-3 : Intervention des systèmes antioxydants dans la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules animales.

▪ Les **superoxyde dismutases** (SOD) sont des métalloenzymes capables de dismuter l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en oxygène et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette réaction est rendue possible par la présence, au niveau du site actif des SOD, d'un métal de transition qui va capter un électron de l'anion superoxyde et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif (Halliwell et Gutteridge, 1999). L'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ne pouvant pas franchir les membranes biologiques, ce dernier va être déttoxiqué au sein même du compartiment dans lequel il a été

formé, justifiant ainsi la présence et la distribution de différentes isoformes des SOD dans différents compartiments biologiques<sup>14</sup> (Orbea et al., 2000).

- Les **glutathion peroxydases** (GPx) catalysent la réduction des peroxydes en leur alcool correspondant. Chez les poissons, la peroxydase majoritaire est la glutathion peroxydase sélénium-dépendante. Il s'agit d'une métalloenzyme tétramérique dont chaque sous-unité contient un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine (Halliwell et Gutteridge, 1999). Cette enzyme qui catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques, est présente dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale où elle joue un rôle majeur dans la lutte contre les processus de lipoperoxydation endogène et exogène (Cossu et al., 1997).

- La **catalase** (CAT) est une hémoprotéine tétramérique qui contient un atome de fer par sous-unité. Cette enzyme est majoritairement localisée dans le cytosol et dans les peroxysomes où elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Cossu et al., 1997; Stegeman et al., 1992). Au regard de son mode d'action et de sa localisation peroxysomale, la catalase est décrite comme complémentaire de la GPx dans l'élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la protection contre la peroxydation.

Les activités des enzymes antioxydantes sont fréquemment utilisées comme biomarqueurs aussi bien dans des études de laboratoire que sur le terrain (Van der Oost et al., 2003). Il apparaît toutefois que la complexité des mécanismes impliqués dans le stress oxydant rend difficile l'interprétation de ces réponses d'un point de vue mécaniste. Elles apportent tout de même une information importante quant à l'exposition des organismes à des polluants inducteurs de stress oxydant et à leur capacité de défense vis à vis de ce dernier.

Les antioxydants non enzymatiques sont nombreux et viennent renforcer l'action des enzymes antioxydantes en agissant comme des réducteurs ou des capteurs d'ERO.

- Le **glutathion** (GSH) est l'antioxydant non protéique majeur dans les cellules animales. Il s'agit d'un tripeptide (*i.e.* L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui agit comme un donneur d'électron. A ce titre, le GSH va réagir avec les radicaux libres pour générer le radical thiyl (GS<sup>•</sup>) responsable de la formation de glutathion oxydé (GSSG) et de l'anion O<sub>2</sub><sup>-</sup> qui sera alors pris en charge par la SOD. Le GSH intervient aussi comme co-facteur des GPx

---

<sup>14</sup> Chez les mammifères, la Cu,Zn-SOD est retrouvée dans la matrice des peroxysomes, le noyau et les lysosomes ; l'EC-SOD au niveau de l'espace interstitiel des tissus et dans les liquides extracellulaires et la Mn-SOD dans les mitochondries.

en tant que donneur d'hydrogène. Il est également impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques où il intervient dans la réaction catalysée par la GST. Le GSSG peut lui aussi réagir avec les molécules présentant un groupement –SH et entraîne alors une perte d'activité de ces molécules<sup>15</sup> (Sies, 1999).

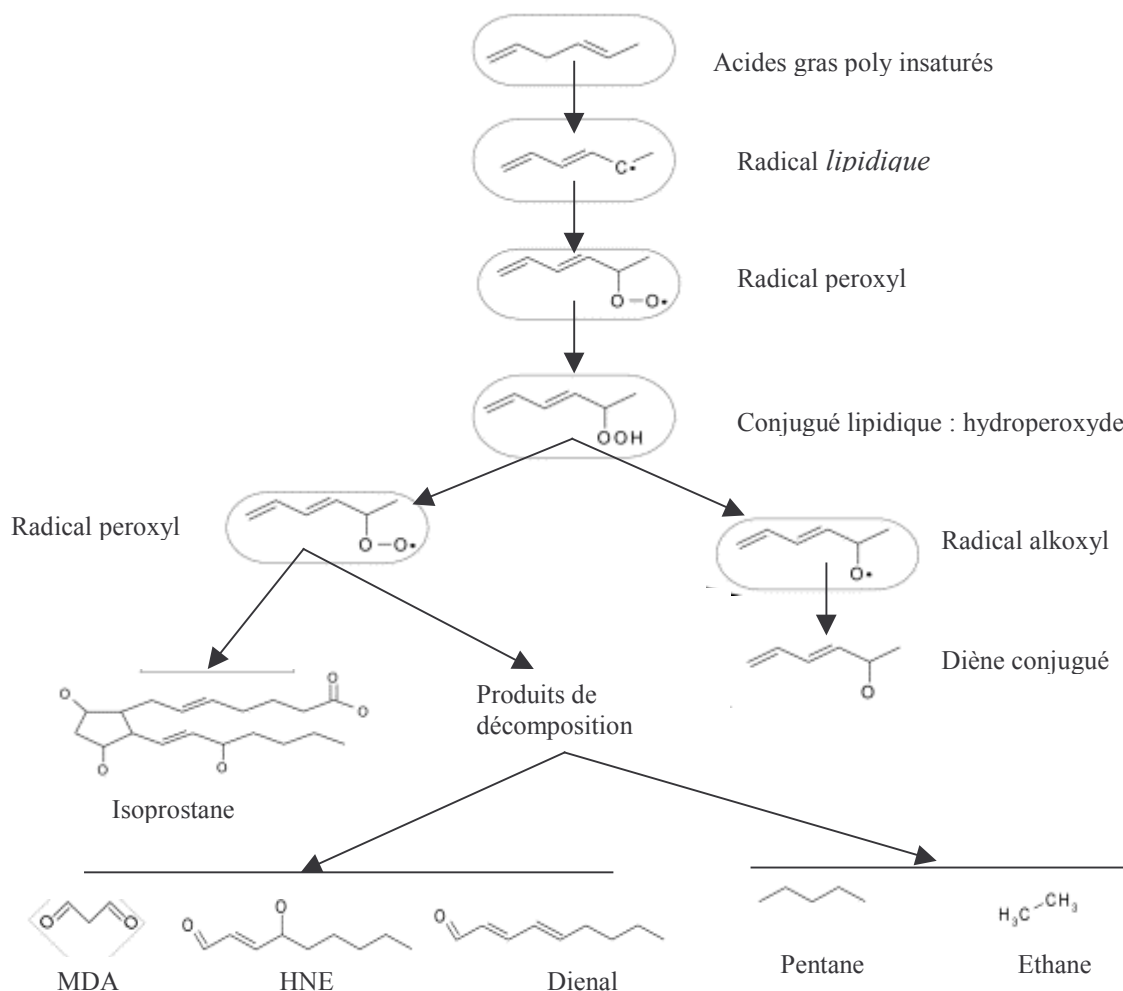


Figure 2-4 : Présentation des différents produits issus de la peroxydation des acides gras poly-insaturés (d'après Dotan et al. (2004).

▪ Les **autres antioxydants non enzymatiques** sont de petites molécules qui vont réduire (*e.g.* acide lipoïque) ou piéger (*e.g.*  $\alpha$ -tocophérol, caroténoïdes, flavonoïdes) les ERO. Contrairement au GSH, peu d'études se sont intéressées au potentiel de ces antioxydants comme biomarqueurs. Certains auteurs se sont toutefois attachés à mettre en place des méthodes de dosage qui permettent de considérer le statut total en antioxydant et non plus la seule réponse du GSH, afin de refléter la susceptibilité réelle des organismes au stress oxydant (Camus et al., 2002; Regoli et al., 2000; Regoli et al., 2002).

<sup>15</sup> Les protéines apparaissent alors comme la cible privilégiée de cette réaction.

Une augmentation importante du flux de molécules oxydantes peut entraîner un dépassement des capacités anti-oxydantes des organismes et générer alors des dommages au niveau des macromolécules. La mesure de certaines de ces altérations constitue un biomarqueur pertinent qui reflète l'exposition à des molécules oxydantes mais également les effets liés à cette dernière.

- La **lipoperoxydation** est le résultat de l'attaque des ERO sur les acides gras poly-insaturés des membranes biologiques. Cette séquence réactionnelle (Figure 2-4) est initiée par l'action d'une espèce radicalaire sur les chaînes carbonées des acides gras qui va générer la formation d'un hydroperoxyde instable et favoriser l'attaque successive des phospholipides voisins. Les hydroperoxydes ainsi formés vont alors se décomposer, par clivage de leur chaîne carbonée, en un mélange complexe de molécules comprenant des alcanes (*e.g.* pentanes et éthane) et des aldéhydes (*e.g.* malondialdéhyde, 4-hydroxy-2-nonenal, dienal) (Dotan et al., 2004; Lackner, 1998). La lipoperoxydation peut être mesurée grâce au dosage des substances réactives à l'acide thiobarbituriques (TBARS). Ce paramètre est largement utilisé *in situ* et est décrit comme un biomarqueur d'intérêt pour caractériser l'impact de la contamination des écosystèmes sur les organismes (Geret et al., 2003; Oakes et Van Der Kraak, 2003).

- La mesure de l'**oxydation d'autres macromolécules** biologiques représente également un marqueur général du stress oxydant. En effet, au même titre que les acides gras, les groupes aminoacyls, méthionine et tryptophane des protéines sont particulièrement vulnérables aux attaques des ERO<sup>16</sup>. Il en résulte alors des modifications structurales qui vont engendrer des modifications fonctionnelles entraînant alors la perturbation des transports ioniques, des activités enzymatiques et de l'homéostasie calcique (Zusterzeel et al., 2001). Parmi ces modifications structurales, la carbonylation des protéines a récemment été mise en avant comme un biomarqueur d'intérêt pour évaluer l'exposition des organismes à des inducteurs de stress oxydant (Parvez et Raisuddin, 2005). Les acides nucléiques sont également une cible potentielle des ERO et les conséquences de ces attaques sont fortement liées à la nature des ERO impliquées. L'anion  $O_2^-$  est responsable des coupures des brins d'ADN et des lésions de bases alors que le radical  $HO^\bullet$  et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) vont générer la formation de 7,8-dihydro-8-oxo-2'-désoxyguanosine (oxo<sup>8</sup>dG) et éventuellement de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua)(Cadet et al., 1997). La oxo<sup>8</sup>dG et la FapyGua, sont des empreintes spécifiques d'un stress oxydant sur l'ADN reconnu pour

---

<sup>16</sup> Les protéines membranaires apparaissent comme plus sensibles en raison de leur proximité avec les radicaux issus de la lipoperoxydation.

être impliqué dans les processus dégénératifs, de vieillissement et de cancérogenèse, et peuvent être utilisées, chez les organismes aquatiques, comme des biomarqueurs du stress oxydant (Charissou et al., 2004; Halliwell et Gutteridge, 1999).

### 2.1.2.3. Les paramètres neuromusculaires

Au niveau des jonctions neuromusculaires et interneuronales, l'influx nerveux est transmis grâce à la libération d'acétylcholine, par la terminaison nerveuse, dans l'espace synaptique où elle va se fixer sur l'un des récepteurs cholinergiques de la membrane post-synaptique. L'interaction entre l'acétylcholine et le récepteur induit une dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx nerveux. Le système retrouve son état de repos suite à l'inactivation de l'acétylcholine par une enzyme responsable de son hydrolyse : l'**acétylcholinestérase** (AChE). Toutefois, une inhibition de l'AChE provoque une accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique et une dépolarisation permanente de la membrane.

De nombreuses molécules sont connues pour leur capacité à inhiber, *in vitro* ou *in vivo*, l'activité AChE (Tableau 2-1). Parmi elles, les composés organophosphorés et les carbamates sont des inhibiteurs historiques. Ces molécules qui sont fréquemment retrouvées dans les écosystèmes aquatiques, sont des inhibiteurs irréversibles de l'AChE qui agissent respectivement par phosphorylation du site estérasique ou par carbamylation de la sérine. D'autres produits phytopharmaceutiques largement impliqués dans la contamination des milieux aquatiques, peuvent aussi inhiber l'AChE bien que ce phénomène ne soit pas leur mécanisme d'action spécifique. C'est le cas des insecticides pyréthrinoïdes<sup>17</sup> (Ghosh, 1990; Reddy et Philip, 1994), des triazines<sup>18</sup> (Davies et al., 1994) mais également du paraquat et des molécules de la même famille (Szabo et al., 1992). Les métaux sont également des inhibiteurs de l'AChE du fait de leur capacité à induire un changement conformationnel de l'enzyme<sup>19</sup> (Kreimer et al., 1994). Toutefois, cet effet qui est non spécifique nécessite une exposition à des concentrations métalliques très élevées par rapport aux concentrations retrouvées dans l'environnement.

---

<sup>17</sup> La cyperméthrine, la perméthrine et la deltaméthrine sont des insecticides de la famille des pyréthrinoïdes.

<sup>18</sup> L'atrazine et la simazine sont des herbicides de la famille des triazines.

<sup>19</sup> En raison de leur mécanisme d'action aspécifique, certains métaux peuvent également induire l'AChE (Barillet et al., 2007).

**Tableau 2-1 : Concentrations inhibitrices à 50% pour différents inhibiteurs de l'acétylcholine de vairon à tête de boule (*Pimephales promelas*) (d'après Olson et Christensen (1980)).**

Molécule	CI <sub>50</sub>	Molécule	CI <sub>50</sub>
Esérine	$3,2.10^{-7}$	Dieldrine	$2,2.10^{-3}$
Néostigmine	$7,1.10^{-7}$	Ergotamine	$2,5.10^{-3}$
Carbaryl	$1,0.10^{-5}$	AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	$3,5.10^{-3}$
Malaoxon	$1,8.10^{-5}$	Méthyl-mercure	$5,0.10^{-3}$
AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$3,2.10^{-5}$	Caféine	$5,0.10^{-3}$
Cu <sup>2+</sup>	$1,6.10^{-4}$	Diazinon	$5,0.10^{-3}$
Au <sup>3+</sup>	$5,0.10^{-4}$	Fe <sup>3+</sup>	$5,7.10^{-3}$
Pd <sup>2+</sup>	$5,0.10^{-4}$	Adrénaline	$5,7.10^{-3}$
Cd <sup>2+</sup>	$5,7.10^{-4}$	Noradrénaline	$5,7.10^{-3}$
Pd <sup>4+</sup>	$6,4.10^{-4}$	Atropine	$5,7.10^{-3}$
Ag <sup>+</sup>	$1,0.10^{-3}$	Nicotine	$5,7.10^{-3}$
Au <sup>+</sup>	$1,4.10^{-3}$	Malathion	$5,7.10^{-3}$
Hg <sup>2+</sup>	$1,6.10^{-3}$	Pb <sup>2+</sup>	$7,1.10^{-3}$
Sn <sup>2+</sup>	$1,8.10^{-3}$	Cr <sup>3+</sup>	$7,1.10^{-3}$
Pt <sup>4+</sup>	$2,2.10^{-3}$	Co <sup>2+</sup>	$7,1.10^{-3}$
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	$2,2.10^{-3}$	Zn <sup>2+</sup>	$1,0.10^{-2}$
Sn <sup>4+</sup>	$2,2.10^{-3}$	Al <sup>3+</sup>	$1,8.10^{-2}$

Du fait du rôle central joué par l'AChE dans la transmission de l'influx nerveux et de la perturbation de cette activité par différents contaminants environnementaux, cette enzyme est largement utilisée comme biomarqueur chez différentes espèces (Corsi et al., 2003; Flammarion et al., 2002a; Payne et al., 1996). En plus de la description du potentiel neurotoxique, il existe une relation entre le taux d'inhibition de l'AChE et des effets délétères au niveau comportemental. Il apparaît que des organismes aquatiques dont le taux d'inhibition est supérieur à 60 % présentent aussi des perturbations du comportement (Cooper et Bidwell, 2006; Kavitha et Venkateswara Rao, 2007; Venkateswara Rao et al., 2006). Les répercussions écologiques non négligeables de ce résultat renforce donc l'intérêt qui est porté à l'AChE en tant que biomarqueur de neurotoxicité.

#### 2.1.2.4. *Les paramètres de la perturbation endocrinienne*

Les perturbateurs endocriniens se définissent comme des agents exogènes qui interfèrent avec la synthèse, la sécrétion, la liaison, l'action, ou l'élimination des hormones naturelles responsables de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ou du comportement (Kavlock et al., 1996). Plus récemment, une composante trans-générationnelle a été ajoutée à cette définition, les perturbateurs endocriniens étant alors décrit comme des substances exogènes qui provoquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance, secondairement à des changements de la fonction endocrine ( World Health Organisation, 2002). Derrière ces définitions se trouvent des molécules aux origines et aux structures diverses<sup>20</sup> mais également aux mécanismes d'action très variés. Les perturbateurs endocriniens peuvent en effet agir (1) au niveau de la glande endocrine où a lieu la synthèse hormonale ; (2) au niveau des protéines plasmatiques de transport en charge du maintien des concentrations hormonales ; (3) au niveau de la capture des hormones par les cellules cibles ; (4) au niveau des enzymes impliquées dans l'activation ou l'élimination des hormones ; (5) au niveau des récepteurs des hormones et des protéines associées qui contrôlent l'expression des gènes.

Il est désormais reconnu que les perturbateurs endocriniens participent à la contaminations de l'environnement aquatique et sont responsables de certaines altérations rencontrées chez les espèces qui y vivent (Sumpter, 1998; Tyler et al., 1998). Aussi, différents biomarqueurs susceptibles de refléter une exposition à des polluants perturbateurs endocriniens ont été développés.

▪ La **vitellogénine** (VTG) est le précurseur des réserves nutritives de l'œuf. La synthèse hépatique de cette glycolipophosphoprotéine est placée sous le contrôle de différentes hormones parmi lesquelles, les œstrogènes, et plus particulièrement le 17 $\beta$ -œstradiol, ont un rôle prépondérant. La fixation d'un ligand<sup>21</sup> sur le récepteur des œstrogènes va induire une cascade réactionnelle qui passe par la fixation du complexe ligand-ER sur l'ADN au niveau de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) et conduit à la synthèse de vitellogénine (Figure 2-5). L'induction du gène codant pour la vitellogénine est dépendante de la quantité de complexe ligand-ER et, en deçà d'une valeur seuil, aucune induction du gène

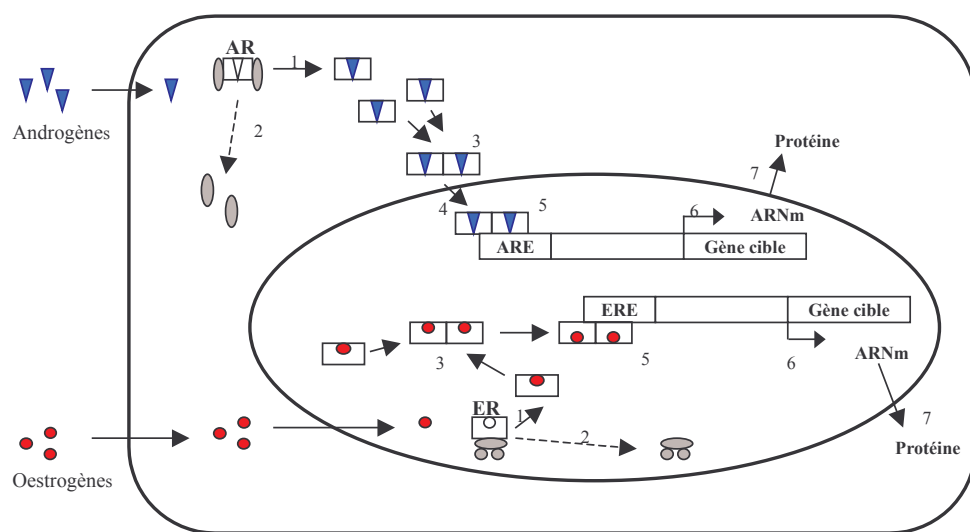
---

<sup>20</sup> Il peut s'agir d'hormones stéroïdiennes naturelles (17- $\beta$  œstradiol, testostérone et leurs dérivés) ou de synthèses (17 $\alpha$ -éthynyl-œstradiol) mais aussi d'alkylphénols, de PCB, de certains pesticides ou de certains phtalates.

<sup>21</sup> Le 17 $\beta$ -œstradiol est le ligand naturel du récepteur des œstrogènes.



n'est observée (Flouriot et al., 1997). Une fois synthétisée, la vitellogénine est transportée par voie sanguine jusqu'aux ovaires où elle est incorporée, par pinocytose, aux oocytes en croissance. C'est à ce niveau que la vitellogénine est clivée par une double protéolyse et forme la lipovitelline et la phosvitine qui sont les protéines constitutives des réserves nutritives nécessaires au développement du futur embryon (Covens et al., 1987). De part sa fonction et son mécanisme de synthèse, la vitellogénine est une protéine qui, en condition normale, est exprimée chez les femelles même si les gènes codant pour cette protéine sont présents chez tous les individus (Rotchell et Ostrander, 2003).



**Figure 2-5 : Mécanisme d'action des agonistes des récepteurs aux œstrogènes (ER) et aux androgènes (AR).** Brièvement, l'hormone lipophile traverse la membrane cytoplasmique et/ou nucléaire pour lier respectivement le ER ou le AR de manière spécifique (1). La liaison de l'hormone entraîne une modification de la conformation du récepteur qui facilite la libération des protéines chaperones (2) et l'homodimérisation des récepteurs (3). Les ARs devront, contrairement aux ERs déjà localisés dans le noyau, subir une translocation nucléaire (4). Dans le noyau, les homodimères AR et ER lient les éléments de réponse des androgènes (ARE) et des œstrogènes (ERE) de l'ADN cible (5) et recrutent les co-activateurs et/ou co-suppresseurs qui moduleront la transcription du gène concerné (6). La traduction de l'ARNm et la synthèse protéique sont la dernière étape de ce processus (d'après Laville, 2005).

De nombreux xénobiotiques peuvent mimer l'action du 17 $\beta$ -œstradiol en se fixant au ER, induisant ainsi la synthèse, dose-dépendante, de vitellogénine aussi bien chez les femelles que chez les mâles et les juvéniles. Cette propriété fait apparaître la vitellogénine comme un biomarqueur d'intérêt pour mettre en évidence une exposition à des composés œstrogéno-mimétiques (Hansen et al., 1998; Marin et Matozzo, 2004; Sumpter et Jobling, 1995; Tyler et al., 1996). Ce biomarqueur est largement utilisée chez différentes espèces aquatiques pour caractériser la contamination des milieux et ses effets sur les organismes (Flammarion et al., 2000; Janssen et al., 1997; Kleinkauf et al., 2004; Lavado et al., 2004). De plus, les connaissances acquises sur ce paramètre permettent d'envisager son utilisation en routine pour la surveillance des milieux aquatiques à l'image de son application dans le cadre

du programme BEST (Hinck et al., 2007; Hinck et al., 2006; Schmitt et al., 2005).

▪ La **spiggin** (SPG) est une glycoprotéine trimérique fortement hydrophobe qui est impliquée dans la construction du nid chez les *Gasterosteidae* en contribuant à l'agglutination des débris végétaux (Jakobsson et al., 1999). Sa synthèse a lieu au niveau des cellules des segments proximaux du néphron et des tubes collecteurs du rein qui se modifient, sous contrôle androgénique, en cellules productrices de spiggin (De Ruiter et Mein, 1982). A ce niveau, la fixation d'un ligand<sup>22</sup> sur le récepteur des androgènes (AR) va induire une cascade réactionnelle qui passe par la translocation nucléaire du complexe ligand-AR et sa fixation sur les éléments de réponse aux androgènes (ARE), retrouvés en amont du gène de la spiggin<sup>23</sup>, induisant alors la synthèse des monomères constitutifs de la spiggin (Figure 2-5). Ces trois sous-unités sont alors excrétées vers la vessie où elles vont s'assembler, grâce à un mécanisme conservé de multimérisation, pour former un agglutinât visqueux et très collant, insoluble dans l'eau (Jones et al., 2001). Le trimère est alors stocké dans la vessie jusqu'à son excrétion pour la construction du nid (De Ruiter et Mein, 1982).

Plusieurs contaminants environnementaux peuvent se lier au récepteur des androgènes (Blankvoort et al., 2005; Thomas et al., 2002) et sont donc susceptibles d'induire la synthèse de spiggin aussi bien chez les mâles que chez les femelles et les juvéniles. La spiggin apparaît donc comme un biomarqueur d'intérêt pour mettre en évidence les propriétés androgéniques des substances chimiques ou l'exposition *in situ* des organismes à ces composés (Katsiadaki et al., 2002b; Katsiadaki et al., 2002a). Ce biomarqueur a d'ailleurs été utilisé avec succès, dans le cadre du programme EDMAR<sup>24</sup>, chez des épinoches encagées pendant 7 semaines dans plusieurs estuaires du Royaume Uni, mettant alors en évidence les effets de la contamination de ces écosystèmes par des androgènes<sup>25</sup> (Allen et al., 2002).

---

<sup>22</sup> La 11-cétotestostérone est le ligand naturel du récepteur des androgènes chez le poisson.

<sup>23</sup> La séquence de ce gène n'a pas encore été clairement identifiée et deux hypothèses sont évoquées avec la présence d'un seul et unique gène codant pour la spiggin qui serait traduit en 3 sous-unités suite à un épissage alternatif des ARNm (Jones et al., 2001) ou l'existence de différents gènes issus d'une super famille et codant pour la spiggin (Kawahara et Nishida, 2006).

<sup>24</sup> EDMAR : « Endocrine Disruption in the MARine environment » est un programme scientifique pluridisciplinaire qui étudie la contamination des rivières et des estuaires du Royaume Uni par les perturbateurs endocriniens.

<sup>25</sup> La dehydrotestostérone, l'androstenedione, l'androstanedione, la 5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ , 11 $\beta$ -diol-17-one, l'androsterone et l'épi-androsterone sont les principaux androgènes identifiés.

Si dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressé aux quatre catégories de biomarqueurs présentées ci-dessus, il existe, dans la littérature, de nombreux autres paramètres décrits et utilisés en tant que biomarqueurs (Van der Oost et al., 2003).

- Les **protéines de stress** peuvent être définies comme des protéines inductibles par des stress environnementaux physiques et/ou chimiques, et qui ont un rôle protecteur vis à vis des dommages générés par ce stress ou, qui sont impliquées dans la régulation génétique de la réponse au stress (Van der Oost et al., 2003). Ce groupe de paramètres est représenté par trois biomarqueurs principaux. Les **protéines de choc thermique** (HSP) sont très ubiquitaires dans le règne animal et participent à de nombreux processus cellulaires<sup>26</sup>. Ces protéines sont inductibles par un stress thermique mais également par d'autres types de stress comme le montrent de nombreuses études réalisées en laboratoire (Lewis et al., 1999; Williams et al., 1996). Leur utilisation *in situ* reste toutefois anecdotique (Triebkorn et al., 1997). Les **métallothionéines** (MT) sont pour leur part impliquées dans la séquestration des métaux et la protection contre les effets induits par ces derniers (Roesijadi, 1996; Viarengo et al., 2000). De part leur spécificité, elles sont considérées comme des biomarqueurs présentant un fort potentiel pour évaluer l'exposition aux métaux des organismes aquatiques (Langston et al., 2002). Les **protéines de résistance multi-xénobiotiques** (MXR) sont des protéines membranaires responsables de l'excrétion des xénobiotiques afin d'en maintenir de faibles concentrations dans les cellules et d'assurer ainsi la survie des organismes dans des milieux contaminés. Du fait de leur capacité de réponse suite à l'exposition à différents polluants, les MXR sont décrites comme des biomarqueurs d'intérêt pour évaluer l'exposition à des contaminants organiques dans les milieux aquatiques (Minier et al., 1999).

- Les **paramètres hématologiques** tels que l'alanine transaminase (ALAT) et l'aspartate transaminase (ASAT) qui sont impliquées dans l'inter-conversion des acides aminés, sont également utilisables en tant que biomarqueurs (Aït-Aïssa et al., 2003; Mayer et al., 1992; Van der Oost et al., 1998). La perturbation de ces enzymes traduit l'existence de dommages cellulaires mineurs générés par la pollution mais également par le parasitisme, la maladie ou la nécrose tissulaire. Ainsi, ces biomarqueurs souffrent d'un manque important de spécificité limitant le développement de leur utilisation. Outre l'ASAT et l'ALAT qui sont les paramètres hématologiques les plus utilisés, d'autres indicateurs sont utilisés comme par

---

<sup>26</sup> Les HSP ont un rôle de protéine chaperonne impliquée dans l'assemblage, la translocation, le ciblage et le maintien de la solubilité des protéines. Elles sont aussi associées aux récepteurs des hormones stéroïdes, impliquées dans le métabolisme du fer, ou dans la constitution du protéasome.

exemple l'hématocrite ou la concentration des macromolécules dans le sang. L'utilisation de ces paramètres reste toutefois marginale (Van der Oost et al., 2003).

- Les **paramètres immunologiques** des organismes aquatiques sont susceptibles d'être modifiés suite à l'exposition à un polluant. En effet, après leur pénétration dans l'organisme, les xénobiotiques vont pouvoir interagir avec différents éléments constitutifs du système immunitaire et induire ainsi des modifications ou des dommages importants au sein de ce dernier. Du fait de la complexité du système immunitaire, de nombreux paramètres, basés sur 1) l'examen histologique des tissus lymphoïdes, 2) le comptage et la détermination du volume occupé par les cellules immunitaires que sont les leucocytes, les granulocytes et les lymphocytes, 3) la mesure des activités de défense telles que la phagocytose ou l'activité du lysozyme, sont utilisables en tant que biomarqueur d'immunotoxicité aussi bien au laboratoire que sur le terrain (Brousseau et al., 1997; Harford et al., 2006; Luengen et al., 2004).

- Les **paramètres génotoxiques** sont le reflet des changements induits par les xénobiotiques au niveau du matériel génétique des organismes. Compte tenu du rôle clé que joue l'ADN dans la transmission de l'information génétique et des conséquences que pourraient avoir son altération, plusieurs biomarqueurs de génotoxicité ont été développés et sont fréquemment utilisés par la surveillance des milieux aquatiques (Devaux et al., 1998; Mc Farland et al., 1999; Wirzinger et al., 2007). Parmi les marqueurs les plus utilisés figurent, 1) la quantification des adduits à l'ADN qui sont issus de la réaction entre des métabolites électrophiles très réactifs et les nucléotides constitutifs de l'ADN, 2) la quantification des cassures de brins grâce au test des comètes, 3) la mesure des altérations chromosomiques de type micronoyaux qui consistent dans la formation de petites structures individualisées suite à la cassure des brins d'ADN.

### 2.1.3. Vers une approche multi-biomarqueurs

#### 2.1.3.1. Intérêt de l'approche multi-biomarqueurs

Aucun biomarqueur ne peut à lui seul prendre en compte la diversité des contaminants et à la multiplicité de leurs effets sur les organismes (Figure 2-6). Ainsi, la mise en œuvre d'un ensemble cohérent de biomarqueurs s'est rapidement imposée afin d'établir un diagnostic complet de l'état de perturbation des organismes au sein de leur environnement (Flammarion et al., 2002b; Galloway et al., 2004a; Minier et al., 2000; Van der Oost et al., 1996). Chaque biomarqueur constitutif de la batterie apporte alors une information en lien avec sa spécificité. Une sélection *a priori* des biomarqueurs doit être opérée afin d'éviter la redondance entre les biomarqueurs mis en œuvre et par la même, de diminuer les coûts des études. Ce travail de sélection doit alors s'appuyer sur la bonne connaissance des réponses des biomarqueurs. De plus, en fonction des objectifs des études, une sélection basée sur la spécificité des biomarqueurs doit être opérée.

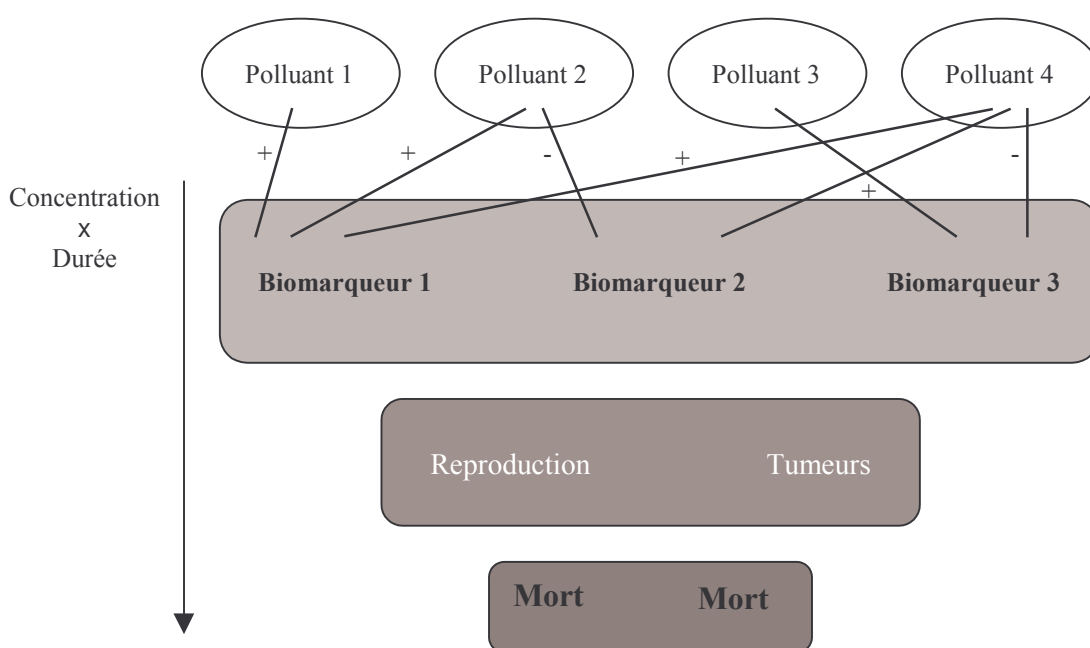


Figure 2-6 : Intégration successive de l'information de l'exposition chimique à la mort (Flammarion, 1997).

Si l'utilisation d'un ensemble cohérent de biomarqueurs contribue à une meilleure caractérisation des effets précoces de la contamination sur les organismes, il semble illusoire d'établir un diagnostic de l'état de contamination des écosystèmes et des effets de cette contamination en s'appuyant uniquement sur la réponse des biomarqueurs. Ainsi, seule une approche multiparamétrique combinant la mesure de différents biomarqueurs, à des analyses chimiques et des mesures au niveau des populations et des communautés, permet de prendre en considération la multiplicité des effets de la contamination sur les différents niveaux d'organisation biologique (Figure 2-7).

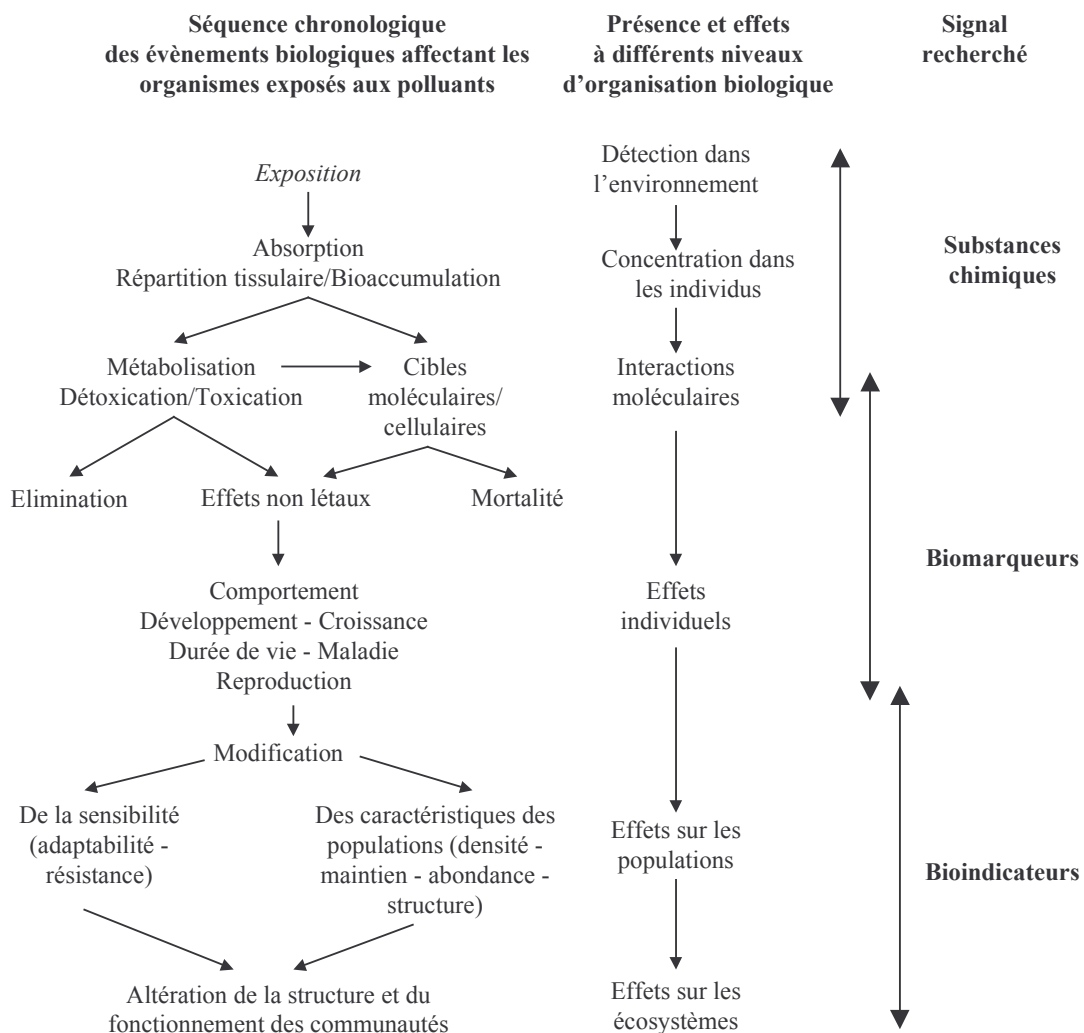


Figure 2-7 : Représentation schématique de l'enchaînement des effets des contaminants sur les différents niveaux d'organisation biologique (d'après Lagadic et al. (1997b)).

### *2.1.3.2. Traitement des données*

En raison du nombre de biomarqueurs utilisés, de la multiplicité des sites d'échantillonnage et des effectifs choisis<sup>27</sup>, les études de surveillance de l'environnement, basées sur l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs, génèrent une importante quantité de données. L'analyse et l'interprétation de ces dernières nécessitent alors de recourir à des méthodes statistiques multivariées telles que l'analyse en composantes principales (ACP) ou l'analyse discriminante (AD) qui permettent de caractériser les relations entre les différentes variables ou de déterminer les différences entre les groupes<sup>28</sup> (Allen et Moore, 2004; Chèvre et al., 2003b). De nombreux exemples d'application de ces outils statistiques, dans des études utilisant une batterie de biomarqueurs, sont disponibles dans la littérature et mettent en avant l'apport de ces méthodes pour l'évaluation globale de la variation des biomarqueurs ou la comparaison des sites (Aarab et al., 2004; Astley et al., 1999; Machala et al., 2001; Van der Oost et al., 1997).

Différentes méthodologies, basées sur le développement d'indicateurs écologiques quantitatifs qui soient capables d'intégrer la réponse d'une batterie de biomarqueurs, ont été mises en œuvre (Tableau 2-2). Ces méthodes peuvent être regroupées sous le terme d'indice « biomarqueurs ». Elles fournissent un résultat, facilement interprétable par les gestionnaires de l'environnement et le grand public, qui permet de comparer les sites étudiés sur la base de la réponse globale des biomarqueurs. Elles sont toutefois la source d'une perte d'information non négligeable qui constitue leur principal handicap. En effet, si la spécificité de réponse de chaque biomarqueur peut être prise en considération grâce à l'utilisation de représentations graphiques adéquates (Beliaeff et Burgeot, 2002; Chèvre et al., 2003a), il semble que les méthodologies développées à l'heure actuelle ne permettent pas de prendre en compte, pour un même paramètre, les effets inducteurs et inhibiteurs, réduisant alors considérablement la qualité du rendu final.

---

<sup>27</sup> Ils sont souvent de 10 individus ou plus afin de réduire le risque de deuxième espèce tout en permettant de détecter des différences biologiquement pertinentes (Flammarion, 1997).

<sup>28</sup> C'est ce que fait l'AD en diminuant la variance intra-groupes et en augmentant la variance inter-groupes.

**Tableau 2-2 : Présentation des différentes méthodologies d'intégration des réponses de biomarqueurs.**

Référence de la méthode	Principe général	Méthode de calcul simple	Utilisation d'un logiciel de statistique	Validation préalable de la méthode	Représentation graphique	Prise en compte de activations et des inhibitions	Prise en compte de la variabilité individuelle	Proportionnalité entre les réponses et l'indice	Utilisation d'une référence valide	Existence de classes (nombre)
Narbonne et al. (1999)	Calcul d'un facteur de discrimination qui est transformé en indice de réponse et somme des indices pour un site	oui	non	non	non	non	non	oui	non	non
Beliaeff et Burgeot (2002)	Normalisation centrée réduite des données et comparaison à la valeur minimale. Représentation sur un graphique en étoile et calcul de l'aire.	oui	non	non	oui	non	oui	non	non	non
Blaise et al. (2002)	Classement des réponses de biomarqueurs en rangs par un test de Mann-Whitney et somme des rangs pour un site.	oui	oui	non	non	non	non	oui	non	non
Chèvre et al. (2003)	Discrétisation des données par analyse des ensembles grossiers et somme de la valeur de chaque classe pour un site.	non	oui	oui	oui	non	oui	oui	non	non
Broeg et al. (2005)	Détermination de classes de réponse pour le biomarqueur le plus intégrateur. Les classes pour les autres biomarqueurs sont alors imposées au sein d'un jeu de données de référence. Somme des valeurs des classes pour un site.	oui	non	non	non	non	oui	oui	oui	oui (4)



## 2.2. ORGANISME CHOISI : L'ÉPINOCHÉ À TROIS ÉPINES

L'épinoche à trois épines est un poisson téléostéen qui appartient à l'ordre des *Gasterosteiformes* et à la famille des *Gasterosteidae* (Figure 2-8). Comparativement aux cyprinidés, et dans une moindre mesure aux salmonidés, cette espèce est peu utilisée en écotoxicologie. Plusieurs arguments concourent toutefois à positionner l'épinoche comme une espèce potentiellement intéressante dans cette discipline et justifient le choix de ce modèle biologique dans le cadre de ce travail.

La biologie de l'épinoche est largement documentée comme en témoignent les différents ouvrages (Bell et Foster, 1994; Östlund-Nilsson et al., 2007; Wootton, 1976; 1984) et les nombreuses publications scientifiques<sup>29</sup> portant sur l'histoire de vie, le comportement, la morphologie, la distribution ou l'écologie de cette espèce. Les détails concernant la biologie de l'épinoche sont rassemblés dans le tableau 2-3.

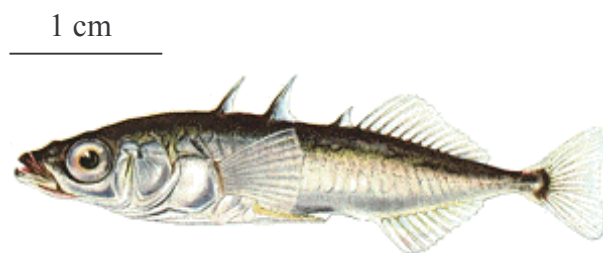


Figure 2-8 : L'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.)

L'épinoche a grandement contribué à la compréhension de la relation entre hormone et comportement chez le poisson (Mayer et Pall, 2007). En conséquence, les aspects physiologiques et comportementaux de la reproduction de l'épinoche sont très documentés, particulièrement chez le mâle (Wootton, 1976). La période de reproduction est comprise entre avril et juillet et se divise en deux phases. Brièvement, au début de la phase sexuelle, une augmentation de la concentration circulante de 11-cétotestostérone chez le mâle induit la mise en place des caractères sexuels secondaires<sup>30</sup>. Le mâle va alors construire un nid qui consiste en un amas de végétaux agglutinés avec de la spiggin<sup>31</sup> puis, courtoiser les femelles par un

<sup>29</sup> Environ 2000 références bibliographiques ont été publiées depuis 1979 sur le thème de l'épinoche (<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Hall/1345/stickbibl.html>).

<sup>30</sup> Les mâles arborent une coloration nuptiale rouge, les yeux s'irisent de bleu et le rein s'hypertrophie.

<sup>31</sup> La spiggin est une protéine hydrophobe, synthétisée, sous contrôle androgénique, pendant la période de reproduction, par les épinoches mâles (Jakobsson et al., 1999).

comportement qualifié de “ danse en zig-zag ”. Les femelles totalement gravides déposent les œufs dans le nid puis le mâle les fertilisent. La phase parentale fait alors suite à la fraie et consiste, pour le mâle, à assurer la protection et l’aération du nid. La très bonne connaissance du comportement reproducteur de l’épinoche et des fondements hormonaux de celui-ci facilitent l’étude de ses perturbations par des contaminants (Bell, 2001; Wibe et al., 2002a).

▪ La petite taille de l’épinoche rend aisée son maintien, sa reproduction et son exposition, au laboratoire, dans des aquariums de faible volume (Katsiadaki, 2007; Wibe et al., 2002b). L’épinoche peut aussi être utilisée comme espèce modèle dans des systèmes plus complexes de type mésocosmes (Axelsson et Norrgren, 1991; Roussel et al., 2007a).

**Tableau 2-3 : Description biologique de l’épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.).**

Morphologie adulte	Taille	3,5 - 8 cm	
	Poids	0,4 - 1,6 g	
Alimentation		pélagique, omnivore à dominance carnivore <i>crustacés, oligochètes, chironomes</i>	(Wootton, 1976)
Reproduction	Age	1 an	(Balon, 1975)
	Saison	avril-juillet	
	Support de ponte	ariadnophile	
Habitat	Rhéophilie	limnophile	(Oberdorff et al., 2002)
	Position	pélagique	
Sensibilité à la pollution		espèce tolérante	
Optimum physico-chimiques	Température	0 - 34,6 <sup>a</sup> °C	(Wootton, 1984)
	Saturation en O <sub>2</sub>	8 - 100 %	
	pH	5,6 - 11,4	

<sup>a</sup> Cette température maximale critique est fonction de la température d’acclimatation et a été obtenue ici après acclimatation à 22,7°C.

▪ L’épinoche est une espèce non migratrice qui colonise les zones tempérées et sub-polaires l’hémisphère nord<sup>32</sup>. Au sein de cette zone géographique, elle est présente, à faible altitude, dans les eaux douces et saumâtres à faible courant. Elle est également retrouvée en mer, à proximité des côtes (Wootton, 1976). Cette relative ubiquité associée à la sédentarité

<sup>32</sup> L’épinoche est retrouvée en Europe, en Amérique du Nord et en Asie. Sa présence a également été observée en Afrique du Nord.

de cette espèce permettent d'envisager son utilisation dans des programmes de biosurveillance environnementale.

- L'épinoche se caractérise par une relative tolérance aux polluants comme le montrent les essais de toxicité aiguë réalisés avec des composés métalliques (Svecevicius, 2006; Svecevicius et Vosyliene, 1996) et organiques (Ernst et Doe, 1989; Ernst et al., 1991; Katz, 1961). Cette résistance explique l'occurrence de l'épinoche dans des écosystèmes aquatiques pollués (Henderson et Hamilton, 1986), et permet d'évaluer des réponses physiologiques précoces par rapport aux effets toxiques aigus.

- Des études se sont intéressées aux effets générés par des contaminants, et dans une moindre mesure par des facteurs biotiques et abiotiques, sur les activités EROD (Holm et al., 1994; Holm et al., 1993) et AChE (Sturm et al., 1999; Wogram et al., 2001). Ces travaux montrent la faisabilité des dosages de marqueurs biochimiques chez cette espèce et mettent en avant son intérêt pour l'étude des réponses biochimiques en conditions contrôlées et sur le terrain.

- L'épinoche permet d'appréhender l'exposition et/ou les effets des composés perturbateurs endocriniens œstrogéno- et androgéno-mimétiques (Katsiadaki et al., 2002a) grâce aux dosages respectifs de la VTG (Hahlbeck et al., 2004; Pottinger et al., 2002) et de la SPG (Katsiadaki et al., 2002b). Cette caractéristique confère à l'épinoche un avantage certain sur les autres espèces classiquement utilisées, aussi bien au laboratoire que sur le terrain, pour l'étude des perturbateurs endocriniens. Plus récemment, un essai de laboratoire basé sur la compétition, *in vivo*, entre un androgène de référence (*i.e.* méthyltestostérone) et un anti-androgène, a été développé afin de mettre en évidence le potentiel anti-androgénique des substances chimiques (Katsiadaki et al., 2006), renforçant ainsi l'intérêt de l'utilisation de l'épinoche pour étudier les effets perturbateurs endocriniens des substances chimiques.

- Le récent séquençage du génome de l'épinoche<sup>33</sup> et l'établissement d'une première version annotée de celui-ci (Kingsley et Peichel, 2007) ouvrent de nombreuses perspectives pour l'utilisation de méthodes génomiques. Parallèlement, plusieurs marqueurs responsables de caractères tels que la morphologie, la détermination du sexe, la respiration ou encore l'adaptation du régime alimentaire ont été identifiés chez l'épinoche (Peichel et al., 2001; Peichel et al., 2004; Shapiro et al., 2004).

---

<sup>33</sup> L'intégralité de la séquence du génome de l'épinoche peut être téléchargée (<http://www.broad.mit.edu/ftp/pub/assemblies/fish/stickleback/gasAcu1/>)

## 2.3. MOLECULES UTILISEES

Afin de caractériser les cinétiques de réponse des biomarqueurs, en conditions contrôlées, plusieurs molécules ont été retenues dont les effets sur les fonctions physiologiques étudiées sont bien documentés. Ces dernières peuvent être classées en deux catégories : les molécules modèles et les contaminants environnementaux.

### 2.3.1. Les molécules modèles

Parmi les molécules modèles, nous avons retenu, la  $\beta$ -naphtoflavone ( $\beta$ NF), le 17 $\beta$ -œstradiol (E2) et la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (17 $\alpha$ MT).

La  $\beta$ NF est un agoniste de forte affinité du AhR, très utilisé pour caractériser l'inductibilité des activités catalytiques du cytochrome P450 chez de nombreuses espèces de poisson (Celandier et al., 1993; Gravato et Santos, 2002; Lemaire et al., 1996; Pretti et al., 2001). De ce fait, de nombreuses données sont disponibles concernant les cinétiques d'induction de l'activité EROD avec cette molécule.

L'E2 est une hormone œstrogénique endogène qui présente une forte affinité pour le ER. Les effets de cette molécule sur la synthèse de VTG ont été particulièrement bien étudiés chez de nombreuses espèces de poissons (Brion et al., 2004; Pawlowski et al., 2004a; Rose et al., 2002) et des données sont déjà disponibles chez l'épinoche (Hahlbeck et al., 2004). Ces molécules sont également à l'origine d'effets anti-AhR par un mécanisme dit de " cross-talk " entre le ER et le AhR (Ohtake et al., 2003). Des inhibitions significatives de l'activité EROD ont été observées chez la limande plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*), le spare doré (*Stenotomus chrysops*) (Gray et al., 1991) et le saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) (Arukwe et Goksøyr, 1997) après une exposition à l'E2.

La 17 $\alpha$ MT est un stéroïde androgénique caractérisé par une forte affinité pour le récepteur des androgènes. Les effets androgéniques de cette molécule ont été caractérisés chez de nombreuses espèces, particulièrement celles utilisées en aquaculture (Blazquez et al., 1995; Pawlowski et al., 2004b) et des données concernant l'induction de la spiggin chez l'épinoche sont disponibles (Hahlbeck et al., 2004; Katsiadaki et al., 2002b).

### 2.3.2. Les contaminants environnementaux

Dans le cadre de ce travail, nous avons choisis de ne pas nous limiter à l'utilisation de molécules modèles et de recourir à des substances qui contaminent les milieux aquatiques.

Ces molécules ont été choisies en raison de leur utilisation ou de leur présence récurrente dans l'environnement et parce que leurs effets sur les fonctions physiologiques étudiées sont documentés. Il s'agit de métaux lourds (*i.e.* cuivre et cadmium) ou de produits phytosanitaires (*i.e.* prochloraz, diquat, diuron, fénitrothion et Agral 90®).

Le cuivre qui est un contaminant majeur de l'environnement pouvant être retrouvé à des concentrations supérieures à 100 µg/L (Roy, 1997). Ce métal est aussi un élément essentiel utilisé comme co-facteur nécessaire à la structure et à l'activité de nombreuses enzymes (Turnlund, 1999). Le cuivre, est décrit comme un inducteur de stress oxydant. Il agit en catalysant la formation d'ERO, telles que le radical OH• formé par la réaction d'Haber-Weiss (Matés, 2000), responsables de la peroxydation des lipides membranaires (Chan et al., 1982) et de dommages à l'ADN (Ozawa et al., 1993). Chez le poisson, de nombreuses études ont mis en évidence la capacité de ce métal à perturber les défenses antioxydantes et à induire des dommages cellulaires (Dautremepuits et al., 2002; Paris-Palacios et al., 2000; Pedrajas et al., 1995). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont aussi mis en évidence la capacité du cuivre à inhiber les activités catalytiques du cytochrome P450 (Ghosh et al., 2001; Stien et al., 1997) par un changement conformationnel de la protéine induit par une interaction directe entre le métal et l'enzyme (Kim et al., 2002).

Le cadmium est un métal qui trouve de nombreuses applications industrielles (*e.g.* batteries, pigments, traitement de surface...) et qui est largement impliqué dans la contamination des milieux aquatiques où on le retrouve fréquemment à des concentrations supérieures à 1 µg/L (Bervoets et al., 2001; Neal et Robson, 2000). Le cadmium n'a pas fonction biologique bénéfique connue et est source de nombreux effets délétères chez les organismes aquatiques. Au niveau cellulaire, ce métal est décrit comme un ligand des molécules possédant des fonctions thiol comme le GSH et les MT (Roesijadi, 1996). C'est également un inducteur de stress oxydant qui agit en augmentant la formation des ERO (Aït-Aïssa et al., 2003; Roméo et al., 2000) qui vont alors interagir avec différentes voies métaboliques comme la métabolisation des xénobiotiques (Aït-Aïssa et al., 2003; Elbekai et El-Kadi, 2005) ou la biosynthèse hormonale (Kime, 1984; Ricard et al., 1998).

Le prochloraz est un fongicide de la famille des imidazoles, utilisé pour la protection des cultures oléagineuses mais également des productions florales et des golfs. Cette molécule participe à la contamination des cours d'eau européen et est fréquemment quantifiée à des concentrations supérieures aux normes de qualité environnementales (DEFRA, 2002; DIREN Ile de France, 2005). Plusieurs études ont mis en évidence la capacité du prochloraz à induire l'activité EROD aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* chez la truite arc-en ciel (*Onchorhynchus*

*mykiss*) (Bach et Snegaroff, 1989; Sturm et al., 2001). Le mécanisme impliqué ne semble toutefois pas nécessiter de fixation sur le AhR mais doit encore être élucidé (Babin et al., 2005).

Le diquat, est un herbicide non sélectif du groupe des bipyridyles, utilisé pour le désherbage de nombreuses cultures, notamment des cultures légumières. Dans les cellules animales, le diquat va être transformé par la NADPH-P450 réductase en radical libre qui va agir comme un donneur d'électrons vis à vis de l'oxygène et générer ainsi la production d'anions  $O_2^-$  peu toxiques en eux-mêmes mais pouvant à leur tour générer des radicaux  $HO^\bullet$  très nocifs. Ces derniers vont réagir avec un certain nombre de constituants et de structures cellulaires, provoquant alors la lipoperoxydation des membranes, la dénaturation de certaines protéines et des altérations de l'ADN (Yumino et al., 2002).

Le diuron est un herbicide de la famille des halogénophénylurées qui est très utilisé, en viticulture notamment, ou comme anti-algue et anti-mousse. Il fait parti des substances phytopharmaceutiques les plus retrouvées dans les milieux aquatiques continentaux. Les concentrations mesurées dans l'eau peuvent atteindre 20  $\mu\text{g/L}$  (IFEN, 2002). Le diuron est un inducteur connu de stress oxydant qui agit en bloquant les transferts d'électrons dans la chaîne électronique entraînant ainsi une activation de l'oxygène. Le transfert d'énergie qui résulte de cette réaction va alors engendrer des phénomènes de dégradation au niveau des macromolécules cellulaires (Geoffroy et al., 2002; Teisseire et Vernet, 2000).

Le fénitrothion est un insecticide organo-phosphoré largement utilisé en France et en Europe où il participe à la contamination des eaux de surface<sup>34</sup> (Morrison et Wells, 1981; Planas et al., 2006). Il est décrit comme un inhibiteur des cholinestérases chez le poisson (Sancho et al., 1997) au même titre que les autres molécules de la famille des organophosphorés (Flammarion et al., 1996; Wogram et al., 2001).

L'Agral 90<sup>®</sup>, est un adjuvant commercial à base de nonylphénols polyéthoxylés (NPEOs) qui est utilisé en mélange extemporané avec le diquat afin de faciliter la pénétration de la substance active dans la plante. L'Agral 90<sup>®</sup>, est un mélange de NPEOs. Parmi les molécules contenues dans ce mélange, les nonylphénols hautement polyéthoxylés sont peu toxiques pour les organismes aquatiques mais leur toxicité s'accroît au fur et à mesure que les processus de biodégradation réduisent la longueur de la chaîne éthoxylée augmentant ainsi l'hydrophobie de la molécule. Le nonylphénol et ses dérivés mono- et diéthoxylés qui sont

---

<sup>34</sup> Des concentrations de 150  $\mu\text{g}$  de fénitrothion/L ont été rapportées dans des cours d'eau espagnols (Planas et al., 2006).

susceptibles d'être contenus dans ce mélange, sont des molécules essentiellement connues pour leur reprotoxicité liée à leur effet œstrogénique (Schwaiger et al., 2002). Les résultats concernant l'induction de la vitellogénine par les NPEOs sont très contrastés et varient en fonction de l'espèce étudiée, du protocole d'exposition mais aussi des molécules utilisées (Nichols et al., 2001; Pedersen et al., 1999). En effet, l'œstrogénicité des NPEOs diminue lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente (Routledge et Sumpter, 1997). Aussi, l'Agral 90<sup>®</sup> peut être considéré comme un inducteur potentiel, de faible affinité. De récents travaux, réalisés chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), ont également mis en évidence le potentiel des alkylphénols à perturber le statut antioxydant de ce poisson par une augmentation de la teneur totale en GSH (Hasselberg et al., 2004a).

Le TétraBromoBisPhénol-A (TBBP-A) fait partie de la famille chimique des retardateurs de flammes bromés. Le TBBP-A qui est produit en quantité importante, est essentiellement utilisé en électronique. Elle est toutefois fréquemment retrouvée dans les milieux aquatiques et dans les organismes qui y vivent en raison de ses propriétés de bioaccumulation (de Wit, 2002). Des études réalisées chez le poisson rouge (*Carassius aurata*) montre que le TBBP-A génère un stress oxydant lié à la production du radical HO<sup>•</sup> qui va induire un phénomène de peroxydation des lipides et des protéines (Shi et al., 2005). Ce résultat est confirmé par les observations de (Ronisz et al., 2004) qui met également en évidence les propriétés oxydantes de cette molécule chez la truite arc-en-ciel.

La classification proposées ici repose toutefois sur une part d'arbitraire puisque certaines molécules modèles sont aussi des contaminants environnementaux avérés. C'est le cas de l'E2 qui est fréquemment retrouvé, dans les effluents et les eaux de surface, à des concentrations susceptibles d'induire la synthèse de VTG (Cargouet et al., 2007; Vethaak et al., 2005) mais aussi de la 17 $\alpha$ MT (Blankvoort et al., 2005; Thomas et al., 2002).



**Tableau 2-4 : Description sommaire des sites d'étude.**

Rivière	Réveillon	Ourcq	Lézarde	Escaut	Rhonelle	Val des Fontaines	Vallon du Vivier	Vilpion
Ville (dept)	Villecresnes (94)	Fère en Tardenois (02)	Epouville (76)	Bruay sur Escaut (59)	Artres (59)	Tancarville (76)	Tancarville (76)	Erlon (02)
Superficie bassin versant (km <sup>2</sup> )	145	87	62	1650	73	10	25	377
Rang de Strahler <sup>a</sup>	2	3	1	4	2	1	1	3
Typologie de Huet <sup>b</sup>	Barbeau	Barbeau	Truite	Brême	Barbeau	Truite	Truite	Barbeau
Perturbation hydrologique <sup>c</sup>	Faible	Nulle	Nulle	Forte	Faible	Nulle	Nulle	Faible
Altération hydro morphologique <sup>c</sup>	Forte	Nulle	Moyenne	Très forte	Nulle	Nulle	Nulle	Moyenne
Pression <sup>d</sup>	Urbain dense	Agriculture intensive	Mixte	Urbain dense	Urbain dense	Mixte	Mixte	Agriculture intensive
Altération chimique sur la station <sup>c</sup>	Urbain, agricole	Agricole	Agricole	Urbain, agricole	Agricole	Agricole	Agricole	Agricole

<sup>a</sup> L'information la plus simple, rapide et homogène à l'échelle du territoire est l'ordination de (Strahler, 1957), dont l'intérêt majeur est de prendre en compte la structure et la densité du réseau hydrographique.

<sup>b</sup> La succession longitudinale des espèces piscicoles est connue, de manière empirique, depuis longtemps. Ces successions sont liées au gradient de conditions physiques qui caractérise l'évolution longitudinale des cours d'eau. A partir des valeurs de pente et de largeur moyenne de la station, le niveau typologique théorique selon le zonage de (Huet, 1949) peut être calculé pour chaque station.

<sup>c</sup> Données obtenues par le Conseil Supérieur de la Pêche.

<sup>d</sup> Données obtenues par la banque de données Eurowaternet de l'Agence Européenne de l'Environnement (EEA, 2001).



## 2.4. SITES ETUDIES

### 2.4.1. Sélection des sites et échantillonnage

Quatre critères ont été retenus pour la sélection des sites d'échantillonnage.

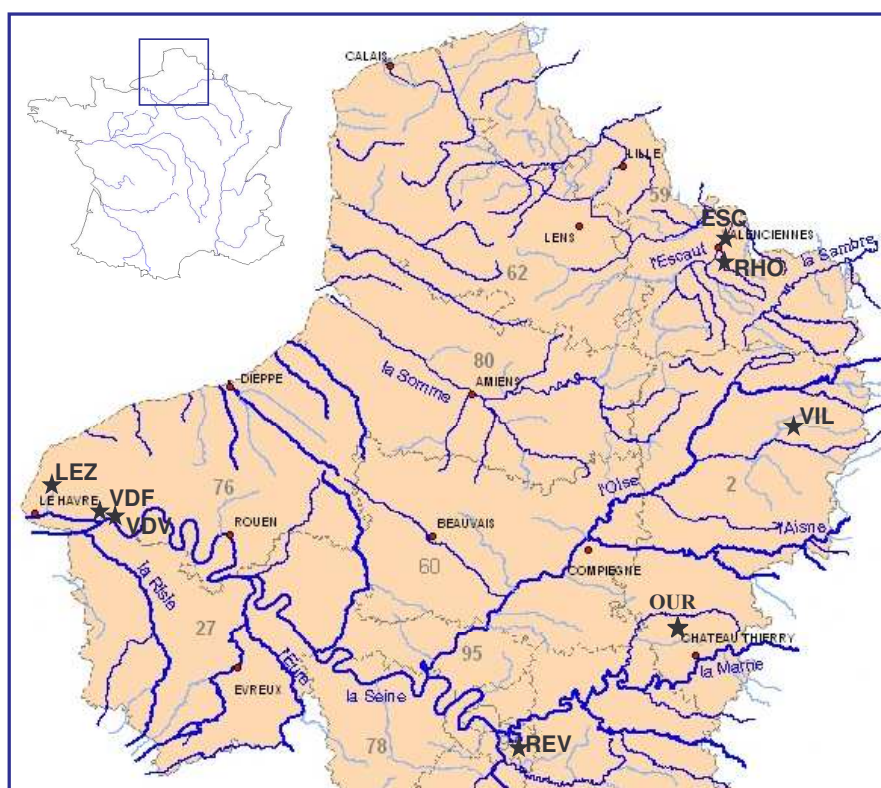
- La présence d'une population d'épinoches suffisamment importante pour être compatible avec l'échantillonnage des poissons effectué dans le cadre de ce travail mais également avec le maintien de cette population suite aux prélèvements.
- La localisation dans un ensemble géographique cohérent afin de réduire la variabilité liée à des facteurs géographiques (Figure 2-9). Dans cette objectif, tous les sites sont échantillonnés dans l'hydro-écorégion des "tables calcaires" telle que définie par Wasson et al. (2002).
- La représentativité en terme de contamination et de qualité du milieu au sein de la région d'étude. Pour appréhender les effets de différents types de contamination chez l'épinoche, les stations sélectionnées se caractérisent par des pressions environnementales variées mais également par des contaminations qualitativement et quantitativement différentes (Tableau 2-4).
- L'appartenance à un réseau de surveillance de la qualité des milieux aquatiques est privilégiée afin de pouvoir disposer des données relatives à la contamination chimique des sites et/ou aux perturbations des différentes populations. Ces informations peuvent alors être utilisées pour expliquer ou compléter nos résultats.

Les stations sélectionnées sur la base de ces critères ont été échantillonnées, entre 2003 et 2006, en fonction des objectifs spécifiques de chaque campagne (Tableau 2-5).

**Tableau 2-5 : Echantillonnage des épinoches au cours de ce travail.**

Sites	2003	2004		2005	2006 <sup>a</sup>
	printemps	printemps	automne	automne	
Réveillon (REV)	X	X	X	X	
Ourcq (OUR)	X				
Lézarde (LEZ)			X	X	
Escaut (ESC)			X	X	
Rhonelle (RHO)			X	X	
Val des Fontaines (VDF)				X	
Vallon du Vivier (VDV)				X	X
Vilpion (VIL)				X	

<sup>a</sup> En 2006, 6 prélèvements ont été réalisés entre avril et octobre afin de caractériser la variabilité saisonnière des biomarqueurs.



**Figure 2-9 : Carte des sites d'échantillonnage dans l'hydro-écorégion des " tables calcaires ".**

### 2.4.2. Description des sites

Le tableau 2-4 décrit sommairement les huit stations étudiées dans le cadre de ce travail.

Les stations de la Lézarde (LEZ), du Val des Fontaines (VDF) et du Vallon du Vivier (VDV) ont été sélectionnées en raison de leur faible niveau de contamination. Elles sont situées sur la zone amont des cours d'eau subissant une pression environnementale mixte<sup>35</sup> et se caractérisent par une absence de contamination directe du milieu. La Lézarde et le Vallon du Vivier peuvent être respectivement impactés par des activités agricoles ou par la présence d'infrastructures routières importantes à proximité qui pourraient être responsables d'une contamination diffuse. Le site du Vallon du Vivier se trouve dans une réserve biologique, à proximité immédiate d'une station de pompage d'eau potable, ne laissant alors apparaître aucune source de contamination évidente.

Les stations du Réveillon (REV) et de la Rhonelle (RHO) sont situées sur des bassins versants essentiellement voués à des activités rurales et agricoles mais sur lesquels les zones pavillonnaires et d'activités présentent une importante croissance depuis plusieurs années. Au niveau des sites étudiés, le Réveillon et la Rhonelle se présentent comme de petits cours d'eau de plaine qui subissent une pression urbaine dense<sup>36</sup> responsable de la dégradation du milieu. Le Réveillon présente en plus une forte altération hydromorphologique expliquant la dégradation du peuplement piscicole.

L'Ourcq (OUR) et le Vilpion (VIL) sont deux rivières dont le bassin versant est faiblement urbanisé et voué, pour sa plus grande majorité, à l'agriculture céréalière. Au niveau des stations d'échantillonnage, il s'agit de petites rivières qui subissent une pression de type agriculture intensive<sup>37</sup> souvent responsable de la mauvaise qualité de l'eau de ces rivières. La population d'épinoches étant très faible<sup>38</sup> sur cette station, l'échantillonnage n'a été réalisé que lors de la première année de l'étude.

L'Escaut (ESC) est un fleuve international qui prend sa source en France puis traverse la Belgique et les Pays-Bas pour atteindre son embouchure en Mer du Nord. La moitié du bassin versant de l'Escaut est située en France où 67% de la superficie est utilisée à des fins agricoles

---

<sup>35</sup> Plus de 50% de la superficie du bassin versant est vouée à l'agriculture et la densité de population est supérieure à 80 habitants/km<sup>2</sup>.

<sup>36</sup> Plus de 10% de la superficie est urbanisée et la densité de population est supérieure à 200 habitants/km<sup>2</sup>.

<sup>37</sup> Plus de 50% de la superficie du bassin versant est vouée à l'agriculture et la densité de population est inférieure à 50 habitants/km<sup>2</sup>.

<sup>38</sup> Elle a été estimée à 13 individus pour 400 m<sup>2</sup> en 2003.

avec essentiellement une agriculture céréalière. L'activité industrielle est également importante sur le bassin avec en premier lieu l'industrie du métal (métallurgie et sidérurgie) qui cohabite avec une industrie automobile en expansion et des activités textiles et agro-alimentaires non négligeables. La station d'étude qui est située très en aval sur la partie française du fleuve, subit une pression urbaine dense responsable de la mauvaise qualité de l'eau.

## Chapitre 3 : Mise en place méthodologique du travail

### 3.1. OBJECTIF

A l'initiation de cette thèse, plusieurs méthodes biochimiques de dosages colorimétriques ou fluorimétriques étaient disponibles au laboratoire pour mesurer la réponse des enzymes de biotransformation, des marqueurs du stress oxydant et de l'AChE chez la truite arc-en-ciel (Aït-Aïssa et al., 2003) et chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Deviller et al., 2005). De même, des stratégies de purification de la VTG (Brion et al., 2000) et des méthodes immuno-enzymatiques permettant le dosage de cette protéine chez différentes espèces de poissons (Brion et al., 2002; Nilsen et al., 2004) avaient été développées. Le premier objectif de ce travail a donc consisté à optimiser, chez l'épinoche, et à valider les dosages biochimiques existant mais également à développer et à valider des méthodes immuno-enzymatiques pour les dosages de la VTG et de la SPG chez cette espèce.

### 3.2. ADAPTATION DES BIOMARQUEURS CHEZ L'EPINOCHÉ

#### 3.2.1. Principe et méthodologie

Pour chaque dosage, différents paramètres participant à la validation du dosage ont été déterminés.

- Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement définies comme étant, la plus petite quantité de substance ou activité d'une enzyme à examiner dans un échantillon pouvant être détectée et, la plus petite quantité de substance ou activité d'une enzyme pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une exactitude définies (Caporal-Gautier et al., 1992a,b). Ces limites sont déterminées à partir des vitesses réactionnelles mesurées pour les " blancs " selon les relations suivantes :

$$LD = m_0 + 3\sigma \quad \text{et} \quad LQ = m_0 + 10\sigma$$

où  $m_0$  est la moyenne des " blancs " et  $\sigma$  l'écart-type associé. Les limites de détection et de quantification sont exprimées en U/mL ou en  $\mu\text{mol/L}$ .

**Tableau 3-1 : Présentations succinctes des méthodes de dosage des biomarqueurs utilisés et de leur validation.**

Biomarqueur (unité)	Organe utilisé	Méthode	Limite de détection Limite de quantification		Limite haute de linéarité de la courbe d'étalonnage		Concentration protéique ou dilution optimale	Référence
EROD (pmol/min/mg)	Foie	Fluorimétrie $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$	$4.10^{-4}$ $1,5. 10^{-4}$	$\mu\text{mol/L}$	2	$\mu\text{mol/L}$	0,5 à 10 mg/mL	Flammarion et al. (1998a)
GST (U/g prot.)	Foie	Colorimétrie $\lambda = 340 \text{ nm}$	0,019 0,061	U/mL	4	U/mL	0,2 à 1 mg/mL	Habig et al. (1974)
SOD (U/mg prot.)	Foie	Colorimétrie $\lambda = 340 \text{ nm}$	0,28 0,33	U/mL	2	U/mL	0,02 à 0,08 mg/mL	Paoletti et al. (1986)
CAT (U/g prot.)	Foie	Colorimétrie $\lambda = 240 \text{ nm}$	0,22 0.30	U/mL	0,1	U/mL	0,01 à 0,05 mg/mL	Babo et Vasseur (1992)
GPx (U/g prot.)	Foie	Colorimétrie $\lambda = 340 \text{ nm}$	0,22 0,33	U/mL	4	U/mL	2,5 à 10 mg/mL	(Paglia et Valentine (1967)
GSH ( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	Foie	Colorimétrie $\lambda = 405 \text{ nm}$	0,713 4.176	$\mu\text{mol/L}$	150	$\mu\text{mol/L}$	Dilution $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{4}$	Vandeputte et al. (1994)
TBARS (nmol/g prot.)	Foie	Fluorimétrie $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$	0,058 0,195	$\mu\text{mol/L}$	1	$\mu\text{mol/L}$	3 à 4 mg/mL	Ohkawa et al. (1979)
AChE (U/mg prot.)	Muscle	Colorimétrie $\lambda = 405 \text{ nm}$	0,0008 0,0017	U/mL	1	U/mL	0,2 à 0,8 mg/mL	(Sturm et al., 2000)

- La zone de linéarité de la droite d'étalonnage est définie par la concentration maximale testée<sup>39</sup> qui permet d'obtenir une relation linéaire entre le signal mesuré et la concentration ou l'activité du standard.
- La charge protéique ou la dilution optimale de l'échantillon permet de réaliser le dosage dans des conditions pour lesquelles le signal obtenu est proportionnel à la dilution de l'échantillon. Ce paramètre est donc intimement lié à la nature de l'échantillon et doit donc être redéfini pour chaque espèce mais également pour chaque organe.

### **3.2.2. Résultats**

Les résultats concernant l'optimisation et la validation de ces dosages chez l'épinoche sont présentés dans le tableau 3-1.

De précédentes études ont montré la possibilité d'utiliser les activités EROD et AChE de l'épinoche aussi bien au laboratoire que sur le terrain (Holm et al., 1994; Holm et al., 1993; Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2000; Wogram et al., 2001). Toutefois, aucune donnée n'était disponible au commencement de cette thèse quant à l'utilisation des marqueurs du stress oxydant chez l'épinoche. La première partie de travail a permis de mettre en avant la possibilité de doser, chez l'épinoche, les enzymes de biotransformation, les marqueurs du stress oxydant et de neurotoxicité sélectionnés et classiquement utilisés en toxicologie de l'environnement.

### **3.3. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES IMMUNO-ENZYMATIQUES**

Les méthodes immuno-enzymatiques développées dans le cadre de ce travail sont des ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) compétitifs. Ces dosages sont basés sur la compétition, entre un standard adsorbé sur une microplaque et une protéine contenue dans l'échantillon, pour un anticorps reconnaissant cette protéine. Le développement d'une méthode ELISA nécessite donc de disposer d'une préparation utilisable comme standard (*e.g.* protéine purifiée) et d'un anticorps reconnaissant, de manière spécifique, la protéine d'intérêt. Suite à leur développement, les méthodes sont validées selon une procédure largement décrite dans la littérature (Brion et al., 2002; Caporal-Gautier et al., 1992a; b; Eidem et al., 2006; Goksøyr et al., 2003).

---

<sup>39</sup> La limite basse de la zone de linéarité est considérée comme étant un " blanc ".

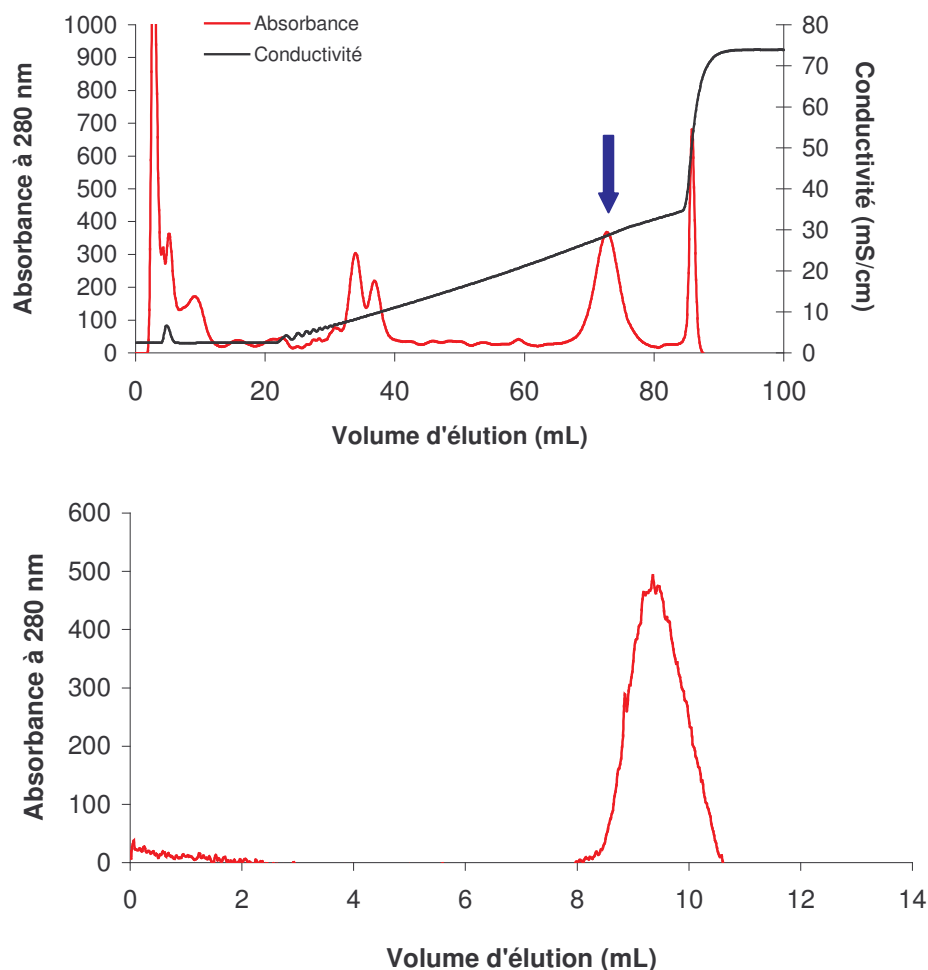


Figure 3-1 : Purification de la vitellogénine d'épinoche. *A.* Profil d'élution obtenu, à partir d'un homogénat de poissons exposés à l'E2, en chromatographie d'échange d'anion. La flèche indique le pic correspondant à la vitellogénine. *B.* Profil d'élution de la vitellogénine d'épinoche en chromatographie d'exclusion-diffusion.

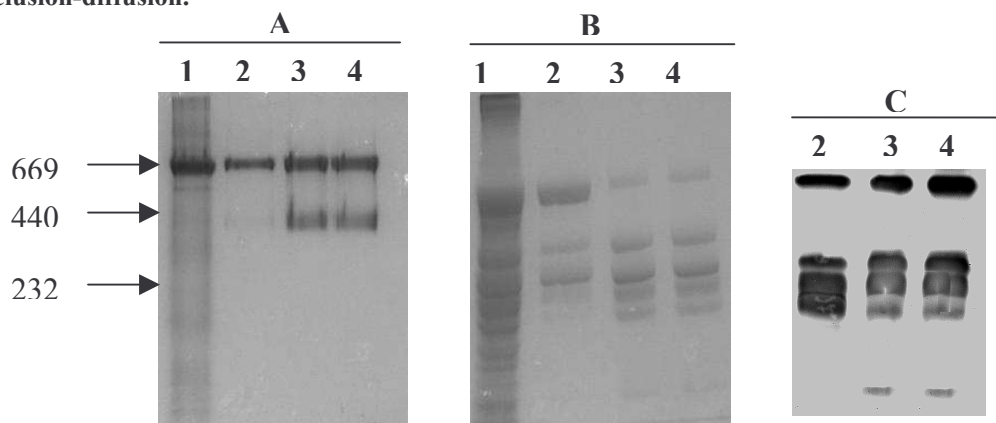


Figure 3-2 : Profils électrophorétiques obtenu pour l'homogénat induit à l'œstradiol (ligne 1), l'échantillon obtenu suite à la chromatographie d'échange d'anions (ligne 2) et l'échantillon obtenu suite à la chromatographie d'exclusion-diffusion (ligne 3 et 4). *A.* Gel obtenu suite à une électrophorèse en conditions natives après coloration au bleu de Coomassie. Les flèches représentent la position du marqueur de poids moléculaire. *B.* Gel obtenu suite à une électrophorèse en conditions dénaturantes après coloration au bleu de Coomassie. *C.* Photographie de la membrane obtenue après Western Blotting en conditions dénaturantes.



### 3.3.1. Dosage de la vitellogénine

#### 3.3.1.1. Purification et caractérisation de la vitellogénine.

La VTG est purifiée selon la méthode développée par Brion et al. (2000). Cette méthode a été appliquée avec succès au laboratoire chez différents poissons comme la truite, le goujon (*Gobio gobio*), le chevaine (*Leuciscus cephalus*) ou encore le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Brion et al., 2002). Les profils d'élution sont présentés sur la figure 3-1A et sont similaires à ceux observés pour d'autres espèces avec un pic de taille importante qui est élué, en chromatographie d'échange d'ions, avec une conductivité de 29  $\mu\text{S}/\text{cm}$  et un pic symétrique en chromatographie d'exclusion-diffusion (figure 3-1B).

Le contrôle de la purification par électrophorèse en conditions natives ou dénaturantes montre que la protéine élue est majoritairement présente dans l'homogénat des poissons induits avec du  $17\beta$ -œstradiol (E2) et se caractérise par un haut poids moléculaire d'environ 500 kDa (figure 3-2A et B) : deux caractéristiques de la vitellogénine. En western blotting, la protéine est reconnue par l'anticorps GA-306 dont la spécificité vis-à-vis de la VTG d'épinoche a été testée par le laboratoire Biosense (figure 3-2C). Toutefois, le gel natif coloré au bleu de Coomassie révèle la présence d'une nouvelle bande dont le poids moléculaire est d'environ 250 kDa et qui correspond probablement à la forme monomérique de la VTG.

#### 3.3.1.2. Détermination des conditions opératoires et validation de la méthode.

Alors que la purification de la VTG a été réalisée en utilisant l'homogénat comme matrice, c'est le sang qui est choisi pour le développement d'une méthode ELISA. En effet, lors d'études multi-biomarqueurs réalisées sur le terrain et au laboratoire, de nombreux organes sont prélevés conduisant alors à une dégradation de la qualité de l'homogénat. Aussi, si le prélèvement sanguin s'avère plus difficile à réaliser, il permet efficacement de palier à ce problème.

- Test de la spécificité des anticorps en ELISA.

Nous avons testé la spécificité de cet anticorps en ELISA non compétitif. Pour ce faire, différents échantillons sont incubés en présence d'une gamme de dilutions d'anticorps primaire. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3-3 et montrent que, pour des

dilutions d'anticorps primaire comprises entre 1/800 et 1/12 800, le signal mesuré est proportionnel à la concentration d'anticorps aussi bien pour un standard de vitellogénine que pour un échantillon induit à l'E2. L'échantillon non induit et le standard de BSA présentent une absorbance très faible qui va augmenter pour les dilutions d'anticorps primaire inférieures à 1/200. Ces résultats confirment la spécificité de l'anticorps GA-306 pour la vitellogénine de l'épinoche d'une part et mettent en évidence un effet de matrice pour les faibles dilutions d'anticorps d'autre part.

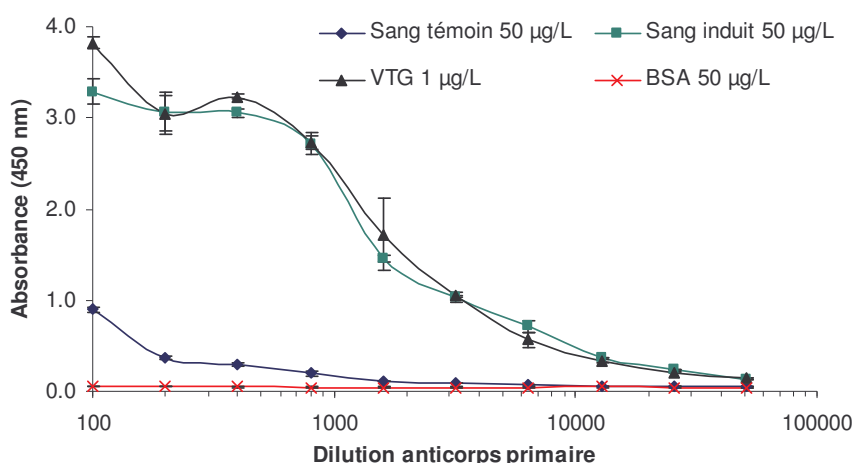


Figure 3-3 : Test de spécificité de l'anticorps primaire GA-306 par ELISA non compétitif réalisé sur du sang total d'épinoche à trois épines.

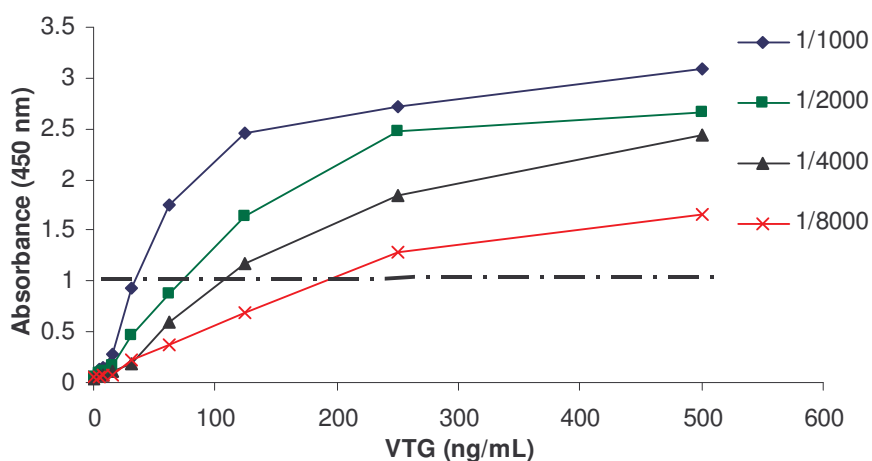


Figure 3-4 : Détermination des concentrations optimales de vitellogénine et d'anticorps primaire (GA-306) pour le développement d'un dosage de la vitellogénine d'épinoche à trois épines par ELISA compétitif.

▪ Détermination des concentrations de « coating » et d'anticorps.

Les concentrations de « coating » de la vitellogénine et d'anticorps primaire à utiliser pour l'ELISA compétitif sont ensuite déterminées grâce à un test de dilutions croisées. 4 combinaisons entre la concentration de « coating » et la dilution de l'anticorps primaire qui associent une absorbance optimale (*i.e.* voisine ou supérieure à 1) à une faible concentration de « coating » de la vitellogénine et à une forte dilution d'anticorps, sont sélectionnées (Figure 3-4). Les combinaisons retenues sont 31,25 ng/mL-1/1 000 ; 62,5 ng/mL-1/1 000 ; 125 ng/mL-1/1 000 et 62,5 ng/mL-1/2 000. Des courbes d'étalonnage sont ensuite générées afin d'évaluer la zone de linéarité et le parallélisme des courbes obtenues pour chacune des conditions sélectionnées. A l'issue de cette étape, une condition intermédiaire utilisant une concentration de vitellogénine de 50 ng/mL et une dilution initiale d'anticorps primaire de 1/1 000 a été choisie.

▪ Validation de la méthode.

Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 3,2 et 20 ng/mL. La zone de linéarité de la méthode est comprise entre 10,8 et 2850,3 ng/mL. Toutefois, afin d'éviter les effets de matrice, il est nécessaire de diluer l'échantillon d'un facteur 80. Les limites de détection et de quantification pour un échantillon sont alors respectivement de 256 et 1600 ng/mL. Au regard de ces résultats, le dosage développé dans le cadre de cette étude apparaît moins sensible que d'autres tests ELISA utilisés pour le dosage de la vitellogénine de différentes espèces modèles (Brion et al., 2002) mais permet tout de même de quantifier la vitellogénine circulante avec une sensibilité supérieure à celle qui est décrite pour des méthodes de dosage indirectes comme le dosage du phosphate ou du calcium (Verslycke et al., 2002). La précision de cette méthode est ensuite évaluée à l'aide des coefficients de variation intra- et inter-essais. Avec des valeurs inférieures à 20 % dans la zone 20-80 % (Tableau 3-2), la méthode peut être considérée comme répétable et reproductible (Goksøyr et al., 2003).

**Tableau 3-2 : Coefficients de variation (CV) intra- et inter-essais pour le dosage ELISA de la vitellogénine avec une concentration de coating de 50 ng/mL et une dilution d'anticorps primaire de 1/1000.**

	Liaison			
	90 %	80 %	50 %	20 %
VTG (ng/mL)	3,2	10,8	118,7	2850,3
CV intra-essais	25,7	15,5	12,0	14,8
CV inter-essais	33,3	19,4	13,9	16,6

### 3.3.2. Dosage de la spiggin

Le développement et la validation du dosage de la SPG par ELISA compétitif sont présentés, de manière détaillée, dans l'article 1. Aussi, ce paragraphe ne reprend que les points clé de ce travail.

#### 3.3.2.1. Sélection d'un anticorps et d'un standard

L'anticorps primaire utilisé pour le dosage de la SPG chez l'épinoche est dirigé contre une séquence peptidique de 16 acides aminés<sup>40</sup> commune aux trois sous-unités de cette protéine et retrouvée uniquement chez celle-ci. Les tests de spécificité, réalisés en western blotting et en ELISA, montrent que l'anticorps est hautement spécifique de la spiggin d'épinoche (Figure 1 de l'article 1).

**Tableau 3-3 : Principales caractéristiques du dosage ELISA de la spiggin et de sa validation.**

Zone de linéarité	0,5 à 6,6 U/mL	
Bi/B0 = 50%	1,8 U/mL	
Limite de détection (standard)	0,01 U/mL	
Limite de quantification (standard)	1,09 U/mL	
CV intra-essais	Bi/B0 = 90%	17,3 %
	Bi/B0 = 80%	13,5 %
	Bi/B0 = 50%	9,7 %
	Bi/B0 = 20%	5,6 %
CV inter-essais	Bi/B0 = 90%	19,6 %
	Bi/B0 = 80%	15,1 %
	Bi/B0 = 50%	12,2 %
	Bi/B0 = 20%	11,2 %
Effet matrice	1/25	
Limite de détection (échantillon)	0,25 U/mL	
Limite de quantification (échantillon)	27,25 U/mL	

Concernant la production du standard, la spiggin est une protéine très hydrophobe (Jones et al., 2001) qu'il est donc difficile de purifier par des méthodes chromatographiques

<sup>40</sup> La séquence peptidique utilisée est HRDELIRDSKLHDHRC.

conventionnelles (Katsiadaki et al., 2002b). Pour contourner ce problème méthodologique, Katsiadaki et al. (2002b) proposent l'emploi d'un pool de reins hypertrophiés comme standard. Aussi, nous avons choisis d'utiliser une méthodologie similaire. Le standard utilisé dans cette méthode, aussi bien pour la génération des courbes de dilution que pour l'adsorption sur les microplaques est un pool de reins hypertrophiés suite à une exposition de poissons mâles à la 17 $\alpha$ MT. Cette méthodologie est en effet rendu possible par la très grande spécificité de l'anticorps pour la SPG de l'épinoche.

### *3.3.2.2. Développement et validation du dosage*

Les résultats de la validation du dosage sont synthétisés dans le tableau 3-3. La méthode apparaît comme sensible, robuste mais également répétable et reproductible. L'écart de réponse mesuré entre un poisson non induit et un poisson fortement induit apparaît toutefois plus faible que celui qui est obtenue par Katsiadaki et al. (2002b). Cette différence peut en particulier s'expliquer par le caractère semi-quantitatif du dosage et la titration arbitraire du standard. Le dosage ELISA développé et validé dans le cadre de cette étude reste toutefois bien plus sensible que la méthode histologique décrite par Borg et al. (1993) ou la mesure de l'indice néphro-somatique (article 1).

## **3.4. CONCLUSION**

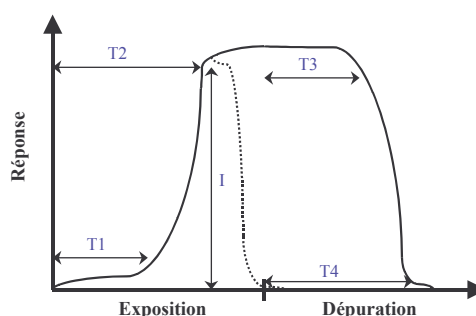
Cette phase méthodologique du travail a permis de transférer, chez l'épinoche, des méthodes de dosage des biomarqueurs classiquement mises en œuvre en toxicologie de l'environnement, permettant ainsi l'étude de la biotransformation des xénobiotiques (EROD et GST), du stress oxydant et de ses effets (SOD, CAT, GPx, GSH et TBARS) et de la neurotoxicité des polluants (AChE). Elle a également abouti à la validation de méthodes immu-enzymatiques robustes et sensibles pour le dosage de la VTG et de la SPG. Ces deux biomarqueurs viennent compléter la batterie déjà disponible et contribuent à l'exploitation du plein potentiel de l'épinoche comme espèce modèle pour l'étude de la perturbation endocrinienne.



## Chapitre 4 : Caractérisation de la réponse des biomarqueurs en conditions contrôlées

### 4.1. OBJECTIF ET METHODOLOGIE

La caractérisation des biomarqueurs, en conditions contrôlées, est un pré-requis indispensable à leur utilisation sur le terrain. Ce travail repose sur l'acquisition de connaissances autour des cinétiques de réponse des biomarqueurs. Il est basé sur la détermination de paramètres cinétiques, spécifiques d'un couple biomarqueur/substance testée, permettant d'appréhender la spécificité, l'inductibilité, la sensibilité et la réversibilité des biomarqueurs (Figure 4-1). Les résultats issus de cette étape de caractérisation permettent d'opérer une première sélection des biomarqueurs présentant un fort potentiel pour une application *in situ* et, facilitent l'interprétation des résultats obtenus par la suite sur le terrain.



**Figure 4-1 : Principaux paramètres cinétiques caractéristiques de la réponse des biomarqueurs. T1, T2, T3 et T4 représentent respectivement le délai de réponse pour l'induction minimale, l'induction maximale, la réversibilité minimale et la réversibilité totale. I représente le facteur d'induction. La ligne en pointillé figure la réponse adaptative des biomarqueurs pendant l'exposition (d'après Wu et al. (2005)).**

Afin de caractériser les cinétiques de réponse des biomarqueurs sélectionnées, des épinoches adultes sont exposées à des substances de référence et/ou à des contaminants environnementaux dont le mode d'action est bien documenté. Les expositions sont réalisées, en conditions semi-statiques, avec une température de l'eau et un cycle jour/nuit compatibles avec le maintien des poissons hors de leur phase de reproduction (température de l'eau =  $13,5 \pm 1,5$  °C, cycle jour/nuit = 8/16 heures). Dans certains cas, suite à l'exposition, les poissons sont maintenus en eau non contaminée afin d'évaluer la réversibilité des réponses induites par les contaminants testés. Le tableau 4-1 présente une synthèse des substances, des concentrations et des temps d'exposition ou de dépuration choisis pour mener à bien cette étape de caractérisation.

**Tableau 4-1 : Quelques exemples d'effet de la  $\beta$ -naphthoflavone et du prochloraz sur l'activité EROD de différentes espèces de poissons peuplant les cours d'eau européens.**

Espèce	Substance	Voie d'exposition	Concentration	Durée	Effet (facteur de réponse)	Référence
Anguille	$\beta$ NF	eau	0,3 $\mu$ M	72 h	Induction (x2)	Pacheco et Santos (1998)
			0,9 $\mu$ M		Induction (x3,5)	
Goujon	$\beta$ NF	injection	1 mg/kg	96 h	Induction (x10)	Flammarion et al. (1999)
			50 mg/kg	96 h	Induction (x19)	
Gardon	$\beta$ NF	injection	100 mg/kg	11 j	Induction (x9)	O'Hare et al. (1995)
Perche	$\beta$ NF	injection	50 mg/kg	72 h	Induction (x4)	Zhang et al. (1991)
Carpe commune	$\beta$ NF	injection	100 mg/kg	96 h	Induction (x12)	Melancon et al. (1981)
Truite arc-en-ciel	$\beta$ NF	eau	0,3 $\mu$ M	72 h	Induction (x27)	Haasch et al. (1993)
				21 j	Induction (x37)	Haasch et al. (1992)
				7 j	Pas d'effet	Sturm et al. (2001)
	Prochloraz	eau	10 $\mu$ g/L	14 j	Pas d'effet	
				7 j	Induction (x3)	
				14 j	Pas d'effet	



## 4.2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.2.1. Induction et inhibition des enzymes de biotransformation

#### 4.2.1.1. Induction de l'activité EROD

L'induction de l'activité EROD a été caractérisée suite à l'exposition des poissons à la  $\beta$ NF et au prochloraz. Les résultats sont présentés et discutés dans l'article 3. Brièvement, la  $\beta$ NF génère des inductions rapides (*i.e.* des effets significatifs sont observés dès 12 heures) et dose-dépendante de l'activité EROD avec des facteurs d'induction maximum de 7, 15 et 18 mesurés chez les poissons exposés 72 heures à 0,3, 0,9 et 2,7  $\mu$ M. Le prochloraz induit l'activité EROD de manière transitoire et plus modérée avec des facteurs d'induction maximum de 3 et 7 après 7 jours d'exposition à 50 et 100  $\mu$ g/L et une disparition de ces effets après 14 jours.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux rapportés chez d'autres espèces de poissons peuplant les cours d'eau européens (Tableau 4-1). Même si les conditions d'exposition entre les études considérées sont différentes, il ressort de ce travail que l'activité EROD de l'épinoche présente une inductibilité comparable à celle qui est retrouvée chez plusieurs espèces comme le goujon ou la carpe (*Cyprinus carpio*). L'épinoche apparaît comme plus inductible que l'anguille (*Anguilla anguilla*) qui se caractérise par des facteurs d'induction très faibles. Elle est toutefois moins inductible, par la  $\beta$ NF, que la truite arc-en-ciel. Les profils de réponse obtenus avec le prochloraz, un inducteur non conventionnel du cytochrome P450 sont similaires entre les deux espèces. Nos résultats mettent en avant la possibilité d'utiliser l'induction de l'activité chez l'épinoche pour évaluer l'exposition à des agonistes du AhR mais également à des inducteurs atypiques comme le prochloraz.

**Tableau 4-2 : Quelques exemples de l'effet du cuivre et du 17 $\beta$ -œstradiol sur l'activité EROD de différentes espèces de poissons.**

Espèce	Substance	Voie d'exposition	Concentration	Durée	Effet (facteur de réponse)	Référence
Daurade	Cuivre	injection	0,2 mg/kg	7 j	Induction (x1,3)	Rodriguez-Ariza et al. (1995)
Bar	Cuivre	injection	0,5 mg/kg	24 h	Pas d'effet	Stien et al. (1997)
	E2	injection	0,5 mg/kg	3 j.	Inhibition (x4)	Vaccaro et al. (2005)
Limande-plie rouge	E2	injection	1 mg/kg	7 j	Inhibition (x2,3)	Gray et al. (1991)
			10 mg/kg	7 j	Inhibition (x3,4)	
Saumon de l'Atlantique	E2	injection	5 mg/kg	7 j	Inhibition (x200)	Arukwe et al. (2000)
				14 j	Inhibition (x10)	Arukwe et al. (1997)
Mulet	E2	eau	2 $\mu$ g/L	72 h	Inhibition (x6)	Cionna et al. (2006)
Morue de l'Atlantique	E2	injection	5 mg/kg	4 sem.	Inhibition (x4)	Hasselberg et al. (2004b)

#### 4.2.1.2. Inhibition de l'activité EROD

L'activité EROD peut être inhibée par divers contaminants tels que les métaux lourds (Rodriguez-Ariza et al., 1995), certains pesticides (Flammarion et al., 1998b) ou encore les xéno-œstrogènes (Arukwe et al., 2000; Hasselberg et al., 2004b). Afin d'évaluer la part de ce phénomène chez l'épinoche, les poissons ont été exposés au cuivre (figure 4 de l'article 2) et à l'E2 (Tableau 4-2).

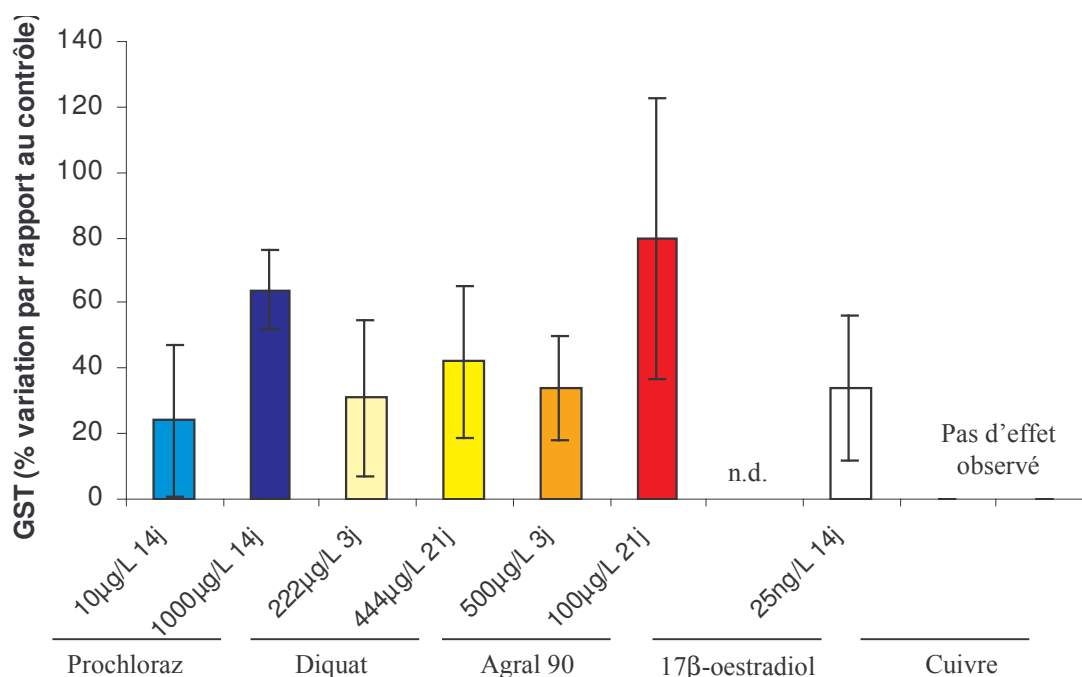
**Tableau 4-3 : Effet d'une exposition de 21 jours à différentes concentration de 17 $\beta$ -œstradiol sur l'activité EROD de l'épinoche. Les données sont présentées sous la forme de moyennes  $\pm$  écart-type. \* indique une différence significative par rapport au contrôle (ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Sidak,  $\alpha = 5\%$ ).**

Concentration (ng/L)	Activité EROD (pmol/min/mg)
0	6,3 $\pm$ 2,1
5	2,8 $\pm$ 2,2 *
25	3,0 $\pm$ 2,7 *
100	2,5 $\pm$ 1,4 *

Brièvement, une exposition à 100  $\mu$ g/L de cuivre pendant 21 jours entraîne une inhibition de l'activité EROD d'un facteur 3. Une exposition de 21 jours à 5, 25 et 100 ng/L d'E2 entraîne également une déplétion de l'activité EROD d'un facteur 2,5. Ces résultats sont en accord avec les observations de Andersson et al. (2007) qui rapportaient une inhibition de l'activité EROD hépatique chez des épinoches exposées 21 jours à 200 ng/L d'EE2. Ces résultats concourent à indiquer que l'activité EROD de l'épinoche est sensible à l'inhibition par les métaux et les œstrogènes, comme c'est le cas pour plusieurs autres espèces. Les taux d'inhibition calculés sont également comparables à ceux décrits pour d'autres espèces de poissons même si les différences dans les modes d'exposition et les concentrations utilisées rendent cette comparaison difficile (Tableau 4-3). Les effets inhibiteurs de ces substances sur l'activité EROD restent toutefois faibles en comparaison des effets inducteurs générés par des substances de référence comme la  $\beta$ NF. Ils ne présument en rien des effets que pourraient avoir ces substances en mélange avec des inducteurs spécifiques de l'activité EROD.

### 4.2.1.3. Réponse de la GST

En conditions contrôlées, la GST apparaît comme un paramètre indépendant du sexe des individus. Afin de caractériser la sensibilité et l'inductibilité de cette enzyme, des épinoches ont été exposées à différents contaminants susceptibles d'interagir avec cette enzyme. Les résultats obtenus suite à l'exposition au cuivre, au prochloraz mais également au diquat et à l'Agral 90<sup>®</sup> sont présentés respectivement dans les articles 2, 3 et 4. La figure 4-2 synthétise ces différents résultats afin de ne retenir que les données nécessaires à la caractérisation de la GST. Il apparaît alors que,



**Figure 4-2 : Réponse de la GST suite à l'exposition à différentes molécules. Lorsque cela est possible, nous avons représenté pour chaque condition testée, l'effet minimum observé et l'effet maximum observé. Les données sont présentées en % par rapport à leur témoin respectif.**

- La GST se caractérise par une faible spécificité. En effet, divers contaminants peuvent induire cette enzyme comme c'est le cas ici pour le prochloraz, le diquat, l'Agral 90<sup>®</sup> ou encore l'E2. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui montrent l'inductibilité de la GST par des molécules similaires comme par exemple le paraquat (Stephensen et al., 2002), le nonylphénol (Uguz et al., 2003) ou l'EE2 (Greco et al., 2007) mais également par un grand nombre d'autres molécules telles que les HAPs, les PCBs (Forlin et al., 1996), les organophosphorés (Monteiro et al., 2006; Rao, 2006).

- Avec des effets significatifs mesurés dès 3 jours d'exposition, la GST peut être considérée comme un biomarqueur rapidement inductible. Cette rapidité de réponse n'est pas

propre à l'épinoche puisqu'elle est également rapporté chez des espèces telles que la truite arc-en-ciel (Stephensen et al., 2002), la gambusie (*Gambusia yucatana*)(Osten et al., 2005) ou le poisson rouge (Zhang et al., 2005). Elle confère à la GST une sensibilité temporelle qui en font un biomarqueur d'intérêt permettant de mettre en évidence les fluctuations de la contamination (Wu et al., 2005).

- Toutefois, cette enzyme est faiblement inductible avec des facteurs d'induction maximum inférieurs à 2. Il s'agit également d'une propriété de l'enzyme qui ne semble pas être liée à l'espèce considérée. En effet, les plages de variation de la réponse de la GST suite à l'exposition à un contaminant sont peu étendues (Forlin et al., 1996; Monteiro et al., 2006; Osten et al., 2005; Stephensen et al., 2002) en comparaison de ce qui est observé pour l'activité EROD. Ainsi, le faible écart de valeurs entre des poissons contrôles et des poissons exposés est source d'un faible pouvoir discriminant de ce biomarqueur face à une exposition à des contaminants.

- La réponse de la GST peut également être persistante dans le temps. C'est ce que nous observons suite à l'exposition au prochloraz puisque les effets mesurés après 14 jours d'exposition sont toujours visibles après 7 jours de dépuración (Article 3). La persistance de la réponse de la GST en fait un biomarqueur intégrateur dans le temps de l'exposition à des polluants (Wu et al., 2005).

## **4.2.2. Caractérisation des biomarqueurs du stress oxydant**

### *4.2.2.1. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques*

Les profils de réponse des antioxydants enzymatiques (*i.e.* SOD, CAT et GPx) et non enzymatique (*i.e.* GSH) ont été caractérisés suite à l'exposition au cuivre, au diquat, au prochloraz et à l'Agral 90<sup>®</sup> et sont présentés dans les articles 2, 3 et 4. Deux caractéristiques principales se dégagent de ces profils.

- La réponse induite par les différentes molécules testées est une réponse rapide. Des effets significatifs sont observés dès la première semaine d'exposition<sup>41</sup>. La rapidité de réponse des paramètres du stress oxydant a été rapporté par différentes études portant sur les

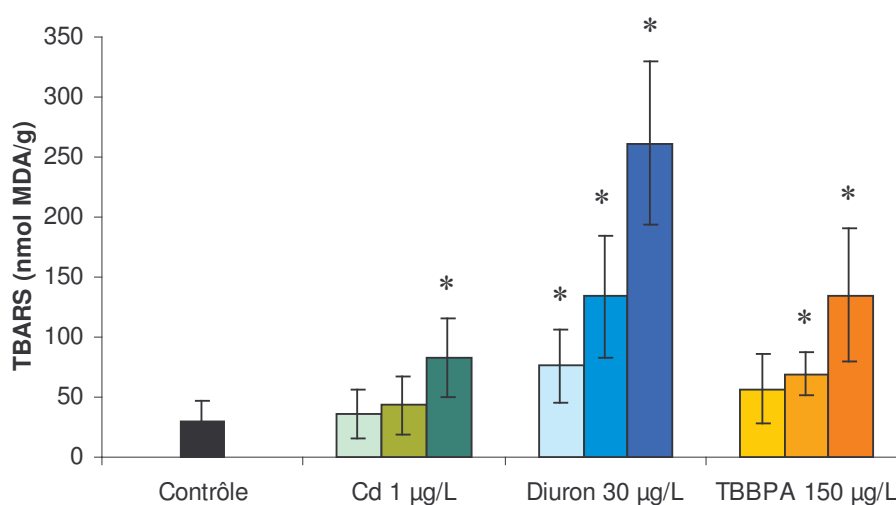
---

<sup>41</sup> L'Agral 90<sup>®</sup> dont l'article 4 ne présente que les effets après 21 jours d'exposition, entraîne une augmentation du GSH après 3 jours d'exposition à 500 et 1000 µg/L. Le diquat quant à lui génère une inhibition de la GPx après 3 jours d'exposition à 222 et 444 µg/L.

effets de polluants divers chez les organismes aquatiques (Paris-Palacios et al., 2000; Pedrajas et al., 1995).

- Les effets observés sur les antioxydants sont transitoires. Ce phénomène pourrait alors être le reflet de l'adaptation des organismes et de la mise en place d'autres mécanismes de protection cellulaire comme par exemple la séquestration des métaux (Freedman et al., 1989) ou la métabolisation des xénobiotiques organiques (Article 3)(Cravedi et al., 2001).

Ainsi, parce qu'ils présentent une réponse à la fois rapide et transitoire, l'interprétation des résultats fournis par ces biomarqueurs s'avère délicate et nécessiterait un échantillonnage régulier. Ces biomarqueurs s'avèrent en effet être peu intégrateurs et pourraient ne refléter qu'une contamination récente (Wu et al., 2005). Nos résultats indiquent également que le stress oxydant généré par les différentes molécules testées va induire la réponse de plusieurs paramètres. Il s'avère donc utile de disposer de différents marqueurs du stress oxydant pour élucider les mécanismes d'action des xénobiotiques mais il est également légitime de s'interroger sur la nécessité de mesurer plusieurs de ces paramètres sur le terrain pour fournir une information relative à l'exposition des organismes.



**Figure 4-3 : Concentrations hépatiques en TBARS mesurées chez des épinoches exposées pendant 7, 14 et 21 jours à du cadmium (1 µg/L), à du diuron (30 µg/L) et à du TBBP-A (150 µg/L). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. \* indique une différence significative par rapport au contrôle (ANOVA suivie d'un test de Sidak,  $p < 0,05$ ).  $n = 10$  poissons par temps d'exposition sauf pour le contrôle où  $n = 25$ .**

#### 4.2.2.2. Peroxydation des lipides : les TBARS

La sensibilité, l'inductibilité et la spécificité des TBARS en tant que biomarqueur du stress oxydant chez l'épinoche ont été caractérisés suite à l'exposition au cadmium, au diuron et au TBBBP-A, trois substances connus pour leur capacité à générer un stress oxydant (Berntssen et al., 2000; Geoffroy et al., 2002; Shi et al., 2005). Les données obtenues, présentées sur la figure 4-3, viennent compléter les résultats concernant les effets du prochloraz, du diquat et de l'Agral 90<sup>®</sup> sur ce biomarqueur (Articles 3 et 4). L'ensemble de ces résultats tend à indiquer que,

- Les TBARS ne représentent pas un biomarqueur spécifique d'une substance ou d'un groupe de substances. Des contaminants environnementaux aussi divers que le cadmium, le diuron, le TBBP-A ou encore les NPEOs peuvent induire ce paramètre. Ce manque de spécificité est conforté par les données de la littérature puisque de nombreuses molécules sont connues pour leur capacité à induire les TBARS au premier rang desquelles figurent les métaux lourds (Baker et al., 1998; Berntssen et al., 2000) et de nombreux produits phytopharmaceutiques (Ozcan Oruc et Usta, 2007; Uner et al., 2006).

- Suite à l'exposition à divers contaminants, le TBARS présente des facteurs d'induction de 9 et 5 fois calculés chez les poissons exposés 21 jours au diuron et au TBBP-A. Ces résultats font apparaître les TBARS comme un biomarqueur fortement inductible leur conférant ainsi une sensibilité accrue. La réponse de ce biomarqueur est également dépendante du temps d'exposition. Toutefois, comparativement aux antioxydants, le temps de réponse des TBARS est long puisque les premiers effets sont observés à 7 jours d'exposition à 30 µg/L de diuron. De ce fait, ce biomarqueur peut être considéré comme peu sensible aux fluctuations de la contamination (Wu et al., 2005).

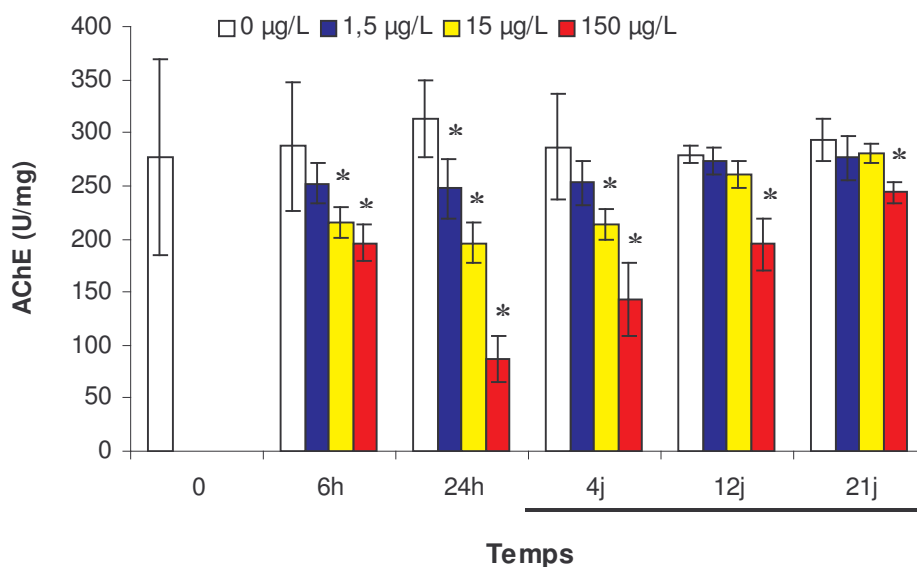


Figure 4-4 : Activité AChE mesurée dans le muscle d'épinoches exposées au fénitrothion. Les temps 4, 12 et 21 jours correspondent à la dépuración des poissons exposés 24 heures. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. \* indique une différence significative par rapport au contrôle (ANOVA suivie d'un test de Sidak,  $p < 0,05$ ).

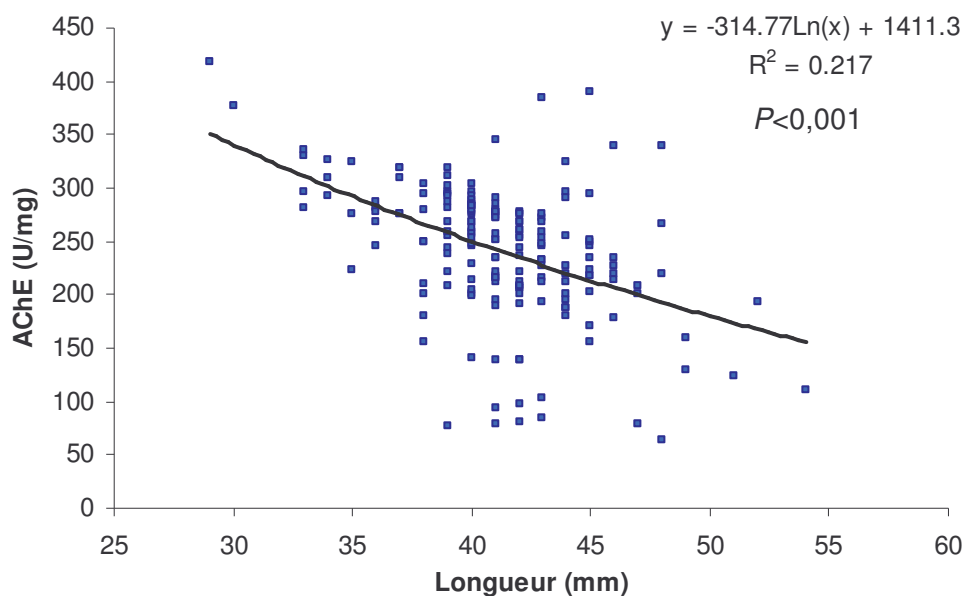


Figure 4-5 : Relation entre l'activité AChE musculaire et la longueur des poissons (n = 176).



### **4.2.3. Caractérisation de la réponse de l'acétylcholinestérase au fénitrothion**

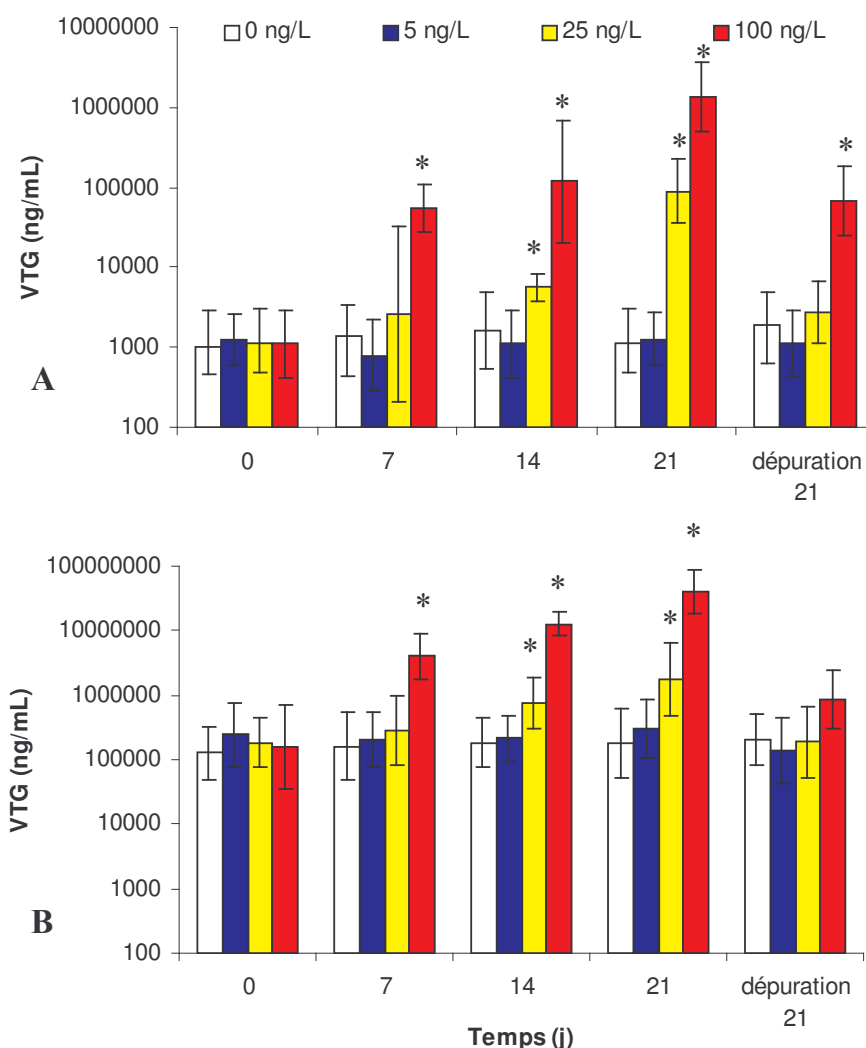
#### *4.2.3.1. Inhibition et récupération de l'activité enzymatique*

L'activité AChE mesurée dans le muscle des poissons non exposés est indépendante du sexe des individus. Ainsi, l'activité basale moyenne mesurée en conditions contrôlées est de  $288,3 \pm 55,5$  U/mg de protéines ce qui est cohérent avec les valeurs précédemment décrites chez cette espèce (Sturm et al., 1999; Wogram et al., 2001). Le profil de réponse observé chez des épinoches exposées au fénitrothion montre que l'inhibition de l'activité AChE est dépendante du temps et de la concentration d'exposition. De plus, il s'agit d'un paramètre sensible, avec des pertes d'activité de 21% mesurées chez des poissons exposés 24 heures à une concentration environnementale de fénitrothion (*i.e.* 1,5 µg/L), et dont la réponse est rapide puisque des inhibitions de 25 et 32% sont mesurées dès 6 heures d'exposition à 15 et 150 µg/L de fénitrothion. Dans ces conditions, une inhibition maximale de 72% est observée après 24 heures d'exposition à 150 µg/L. L'inhibition provoquée par le fénitrothion est réversible comme le montre le maintien des poissons en milieu non contaminé. Toutefois, le retour à des valeurs physiologiques est lent puisque les effets du fénitrothion sont retrouvés après 4 jours de dépuration et le sont toujours, pour la plus forte concentration testée (*i.e.* 150 µg/L) après 21 jours (Figure 4-4). Le profil de réponse observés dans ce travail sont similaires en terme de sensibilité et de récupération de l'activité AChE à ceux qui ont été décrits chez de nombreux organismes aquatiques suite à l'exposition à des organophosphorés (Escartin et Porte, 1996; Sancho et al., 1998; Uner et al., 2006).

#### *4.2.3.2. Influence de la longueur sur l'activité AChE*

Il a été démontré que l'activité AChE est influencée par l'état de maturité des poissons (Chandrasekara et Pathiratne, 2007; Flammarion et al., 2002a; Sturm et al., 1999). Sturm et al. (1999) ont rapporté, chez l'épinoche, l'existence d'une relation négative entre l'activité AChE mesurée dans le muscle et la longueur ou la masse des individus. Nos résultats mettent également en évidence cette relation (Figure 4-5). Afin de prendre en compte ce facteur de variabilité dans l'interprétation des résultats, nous avons choisi de normaliser les valeurs d'AChE selon la méthode décrite par Flammarion et al. (2002a). Pour ce faire, la relation linéaire entre l'activité AChE et la longueur des poissons non exposés, après log-

transformation des données est déterminée. Bien que la relation obtenue soit significative<sup>42</sup>, la faible pente de la droite n'entraîne pas de modification significative entre les données normalisées et les données non normalisées. Ce résultat est explicable par la faible variation de la longueur des poissons contrairement à ce qui est observé pour une espèce comme le chevaïne (Flammarion et al., 2002a). Nous pouvons donc en conclure que dans le cadre de notre travail, la normalisation par la longueur des poissons peut être ignorée.



**Figure 4-6 : Concentration de vitellogénine circulante mesurée chez des épinoches mâles (A) et femelles (B) exposées au 17β-œstradiol pendant 7, 14 et 21 jours puis après 21 jours de dépuración. Les données sont présentées sous la forme moyenne géométrique ± IC<sub>95%</sub>. \* indique une différence significative par rapport au contrôle (test de Mann-Whitney, p<0,05).**

<sup>42</sup> On obtient une relation d'équation :  $\text{Ln(ACHe)} = -0.0231\text{Ln(longueur)} + 6,571$  ; avec  $R^2 = 0,1773$  et  $p = 0,002$ .

#### **4.2.4. Inductibilité et sensibilité des marqueurs de la perturbation endocrinienne**

##### *4.2.4.1. Vitellogénine et œstrogénicité*

Si la VTG est un biomarqueur largement décrit chez de nombreuses espèces, seul un nombre limité d'études se sont intéressées à la réponse de ce biomarqueur chez l'épinoche (Andersson et al., 2007; Covens et al., 1987; Hahlbeck et al., 2004). Aussi, afin de caractériser le profil de réponse de la VTG chez cette espèce, les poissons ont été exposés à différentes concentrations d'E2 pendant 7, 14 et 21 jours puis maintenus en absence de contamination pendant 21 jours. Les résultats obtenus, chez les mâles et chez les femelles, sont respectivement présentés sur la figure 4-6.

Ils montrent que les femelles hors de leur période de reproduction, présentent un niveau basal de VTG (*i.e.*  $177 \pm 50$  µg/mL). Il en va de même chez les mâles mais les concentrations détectées sont beaucoup plus faibles (*i.e.*  $1,1 \pm 0,1$  µg/mL). La présence de concentrations de VTG circulante chez les poissons mâles a déjà été observée chez la truite fardée (*Oncorhynchus clarki*) (Fukada et al., 2001), chez la sole marbrée (*Pleuronectes yokohamae*) (Bessho et al., 2000) et chez le poisson zèbre (Brion et al., 2002) et elle pourrait s'expliquer par l'effet de l'E2 endogène des mâles. Tyler et al. (1999) indiquent que les faibles niveaux de VTG mesurés pour s'expliquer par la présence d'œstrogènes de faible affinité dans la nourriture. Nos résultats montrent également que, chez l'épinoche, la VTG est une protéine inductible par l'E2 comme cela avait été mis en évidence par Covens et al. (1987). Chez le mâle, une induction significative de la VTG est observée dès 7 jours d'exposition pour les poissons exposés à 100 ng/L (*i.e.* 50 fois par rapport au contrôle) et dès 14 jours pour une exposition à 25 ng/L (*i.e.* 5 fois par rapport au contrôle). L'induction maximale est obtenue pour les poissons exposés 21 jours à cette même concentration avec un facteur d'induction de 1300 par rapport au contrôle. Ces facteurs d'induction montrent que la VTG est un paramètre moins inductible chez l'épinoche qu'il ne l'est chez des espèces telle que la truite arc-en-ciel ou le poisson zèbre (Tableau 4-5). L'inductibilité de cette espèce reste toutefois comparable à celle d'autres poissons comme par exemple le flet qui est largement utilisé pour la surveillance des effets œstrogéniques en milieu marin et estuarien (Kirby et al., 2004; Kleinkauf et al., 2004). Nos résultats mettent également en avant le caractère réversible de la réponse de la VTG. Toutefois, cette récupération est lente et les effets induits

**Tableau 4-5 : Quelques exemples d'induction de la vitellogénine par le 17 $\beta$ -œstradiol chez différentes espèces de poisson.**

Espèce	Voie d'exposition	Concentration	Durée	Facteur induction	Référence
Loche d'étang	Eau	500 ng/L	14 j.	x 5	Lv et al. (2006)
Flet	Eau	100 ng/L 333 ng/L	10 j.	Pas d'effet x 1000	Kirby et al. (2007)
Poisson zèbre	Eau	5 ng/L	21 j.	Pas d'effet	Brion et al. (2004)
		25 ng/L		x 8	
		100 ng/L		x 7500	
		100 ng/L 1 $\mu$ g/L	7 j.	x 500 x 18 000	Brion et al. (2002)
Bar	Injection	0,5 mg/kg	14 j	x 1300	Vaccaro et al. (2005)
Loquette d'Europe	Eau	500 ng/L	96 h.	x 30 000	Andreassen et al. (2005)
Chevaine	Injection	2 mg/kg	14 j.	x 100 000	Flammarion et al. (2000)
Truite arc-en ciel	Eau	247 ng/mL	7 j.	x 20 500	Thorpe et al. (2000)
			14 j.	x 51 300	
			21 j.	x 102 500	
Vairon à tête de boule	Eau	300 ng/mL	7 j.	x 350 000	Nilsen et al. (2004)

par une exposition de 21 jours à 100 ng E2/L sont toujours visibles après 21 jours de dépuration. La VTG peut donc être considérée comme un biomarqueur intégrateur susceptible de révéler une exposition ancienne à la contamination (Wu et al., 2005).

#### 4.2.4.2. *Spiggin et androgénicité*

Plusieurs études se sont intéressées à la réponse de la SPG suite à l'exposition d'épinoches à des androgènes de référence (Hahlbeck et al., 2004; Katsiadaki et al., 2002b), à des effluents d'usine de pâte à papier (Katsiadaki et al., 2002b), à des produits phyto-pharmaceutiques (Katsiadaki et al., 2006) ou à des œstrogènes (Andersson et al., 2007; Hahlbeck et al., 2004). Aussi, la SPG peut être considéré comme le biomarqueur le mieux décrit chez l'épinoche. Notre travail s'est donc limité, outre le développement d'une méthode originale de dosage, à l'étude de la réponse induite par deux concentrations de 17 $\alpha$ MT. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans l'article 1. Ils montrent que la SPG est significativement induite après 21 jours d'exposition à 0,1 et 1  $\mu$ g/L confirmant ainsi les résultats de Katsiadaki et al. (2002b) qui indiquent grossièrement une concentration de 17 $\alpha$ MT minimale induisant un effet de 0,1  $\mu$ g/L. Dans notre étude, les poissons utilisés n'étant pas en période de reproduction, les mâles et les femelles présentent une sensibilité et une inductibilité similaires laissant ainsi envisager la possibilité d'utiliser indifféremment chaque sexe pour la mesure de la SPG *in situ* lorsque l'échantillonnage a lieu hors de la période de reproduction.

### 4.3. CONCLUSION

Ce travail a tout d'abord permis de mettre en évidence le fait que la réponse des biomarqueurs chez l'épinoche est comparable, en terme de sensibilité et d'inductibilité, à celle qui est observée chez d'autres espèces de poissons couramment utilisées pour la surveillance des milieux aquatiques. Il a également contribué à une meilleure définition des avantages et des limites des biomarqueurs sélectionnés. Cette étude atteint toutefois ses limites en ne prenant pas en considération les effets des mélanges entre les contaminants qui sont susceptibles de modifier les profils de réponses des biomarqueurs et pourraient contribuer à une caractérisation plus rigoureuse de ces derniers.



## Chapitre 5 : Evaluation des biomarqueurs *in situ*

Ce chapitre rassemble les résultats acquis *in situ* et qui concourent à la validation de l'épinoche comme espèce sentinelle utilisable pour la surveillance des milieux aquatiques à l'aide d'un ensemble cohérent de biomarqueurs. Il s'articule autour de trois parties qui présentent respectivement l'évaluation du potentiel de l'épinoche comme espèce sentinelle et la caractérisation de valeurs basales et de leur variabilité avant de s'attacher à positionner les biomarqueurs par rapport à d'autres mesures environnementales.

### 5.1. EVALUATION DU POTENTIEL DE L'ÉPINOCHÉ COMME ESPÈCE SENTINELLE

#### 5.1.1. Objectifs et méthodologie

Différents travaux antérieurs à ce travail avaient mis en avant la possibilité d'utiliser des paramètres biochimiques (*i.e.* AChE et SPG) ou histologiques mesurés chez des épinoches, autochtones ou encagées, afin d'évaluer la qualité des milieux aquatiques (Allen et al., 2002; Handy et al., 2002; Sturm et al., 2000). Toutefois, aucune donnée n'était disponible quant à la possibilité de mesurer, chez des épinoches échantillonnées *in situ*, les autres biomarqueurs sélectionnés dans le cadre de cette étude, et à la pertinence d'une approche multi-biomarqueurs chez cette espèce. Ce premier volet de notre travail *in situ* doit donc permettre l'évaluation du potentiel de l'épinoche comme espèce sentinelle utilisable pour évaluer les effets de la contamination des cours d'eau à l'aide d'un ensemble de biomarqueurs complémentaires (*i.e.* EROD, GST, GPx, GSH et TBARS) et permettre la discrimination des sites étudiés. Pour ce faire, les variations de la réponse des biomarqueurs entre différents sites, caractérisés par des contaminations qualitativement et quantitativement différentes, sont étudiées au même titre que l'effet de facteurs tels que la saison d'échantillonnage ou le sexe des individus sur les niveaux physiologiques et/ou la réponse de ces biomarqueurs. Pour atteindre ces objectifs et en raison de la difficulté à trouver un site d'étude exempt de contamination, les mésocosmes lothiques de l'INERIS ont été choisis comme site non contaminé<sup>43</sup> utilisable en tant que référence pragmatique dans notre étude. Ainsi, les réponses mesurées chez les poissons collectés *in situ* peuvent être comparés aux valeurs obtenues en

mésocosmes. Afin d'appréhender la variabilité saisonnière des biomarqueurs, les poissons ont été échantillonnés au cours de deux saisons (printemps et/ou automne), sur deux années consécutives.

Cette première partie du travail a également pour objectif d'appréhender la notion de réversibilité des réponses des biomarqueurs mesurées *in situ*. Pour ce faire, des poissons échantillonnés sur un site fortement impacté (*i.e.* REV) sont maintenus, en condition contrôlées, sans contamination, pendant 15 jours au cours desquels les cinétiques de dépuración sont mesurées.

### 5.1.2. Résultats et discussion

#### 5.1.2.1. Réponse des biomarqueurs et discrimination des sites

Les épinoches prélevées sur les différents sites d'étude présentent des profils de réponses des biomarqueurs différents (Tableau 3 de l'article 5) qui sont en adéquation avec les pressions environnementales et la qualité du milieu sur les sites étudiés.

- L'activité EROD est induite sur les stations du REV et de l'ESC avec des facteurs d'induction maximum respectivement de 8,8 et 5,5 par rapport aux poissons témoins des mésocosmes. Ce résultat tend à indiquer que les poissons sont exposés à des ligands du AhR, ce qui est confirmé, pour l'ESC, par les données relatives à la contamination du milieu (Tableau 5-1). Elles mettent en évidence des concentrations élevées en HAPs dans l'eau.

- Les paramètres du stress oxydants apparaissent comme un bon indicateur des effets de la contamination sur les poissons. Les résultats obtenus montrent clairement que, par rapport aux observations en mésocosmes et sur le site faiblement impacté (LEZ), les épinoches collectées sur les sites soumis à des pressions urbaines (REV, RHO et ESC) ou agricoles (OUR) voient leur défenses antioxydantes perturbées et subissent les effets du stress oxydant comme le montrent les inductions de TBARS. En raison de la diversité des molécules capables de générer un stress oxydant (Winston et Di Giulio, 1991), il est toutefois impossible de lier les effets mesurés chez le poisson à une contamination spécifique.

---

<sup>43</sup> Les mésocosmes sont alimentés par de l'eau du réseau dénitratée à un débit de 800 L/heure. Une description plus détaillée des mésocosmes est faite dans les articles de Roussel et al. (2007a,b).



**Tableau 5-1 : Concentrations en HAPs mesurées dans l'eau, en octobre 2004, au niveau de la station de Fresnes sur Escaut. Source : Agence de l'eau Artois-Picardie, Réseau International de Mesures sur l'Escaut.**

	Concentrations (µg/L)
Fluoranthène	0,770
Benzo (b) fluoranthène	0,057
Benzo (k) fluoranthène	0,021
Benzo (a) pyrène	0,036
Benzo (g,h,i) pérylène	0,043
Indéno (1,2,3,c,d) pyrène	0,033
Anthracène	<0,005

▪ L'indice hépato-somatique (HSI) et le facteur de condition (FC) sont des paramètres intégratifs qui reflètent l'état physiologique des poissons. Si leurs variations peuvent être imputées à divers facteurs tels que le statut reproducteur, la disponibilité de la nourriture (Pottinger et al., 2002), plusieurs études ont montré l'intérêt d'utiliser ces paramètres pour évaluer les effets d'un stress environnemental au niveau de l'organe et de l'organisme (Eastwood et Couture, 2002; Schmitt et al., 2005). Dans notre étude, peu de variations sont observées pour ces deux indicateurs puisque seul le HSI des poissons provenant des sites les plus impactés (*i.e.* REV, RHO et ESC) sont plus élevés que ceux des poissons témoins.

Si la réponse spécifique de chaque biomarqueur apporte une information pertinente quant à l'exposition des poissons à des contaminants et aux effets de cette dernière, elle permet également de discriminer les sites d'étude (Tableau 5-2, Figure 1 de l'article 4). Force est toutefois de constater que, si tous les biomarqueurs participent à la discrimination des sites, ils n'ont pas le même poids dans l'analyse. Pour cette étude, les TBARS sont le biomarqueur le plus discriminant suivi de la GST, de l'EROD, du GSH et de la GPx. Les paramètres physiologiques que sont le HSI et le FC sont les paramètres les moins discriminants.

**Tableau 5-2 : Résultat de l'analyse discriminante suivi d'un test de validation croisée, réalisée sur l'ensemble des sites et des périodes d'échantillonnage de l'étude, avec l'EROD, la GST, la GPx, le GSH, les TBARS, le HSI et le FC comme variables. Les résultats sont présentés en % et les valeurs en gras indiquent le pourcentage de bon classement.**

		Printemps 2003			Printemps 2004			Automne 2004		
		REV	OUR	MESO	REV	MESO	MESO	LEZ	RHO	ESC
Printemps 2003	REV	<b>42,9</b>	0	0	3,6	0	0	0	3,6	50
	OUR	16,7	<b>50</b>	8.3	8.3	0	0	0	0	16,7
	MESO	8	8	<b>60</b>	0	20	0	4	0	0
Printemps 2004	REV	6.3	12.5	0	<b>62.5</b>	6.3	0	0	0	12.5
	MESO	0	0	6,7	6,7	<b>40</b>	20	26,7	0	0
Automne 2004	MESO	0	6,7	6,7	0	16,7	<b>43,3</b>	26,7	0	0
	LEZ	0	0	3,7	0	11,1	18,5	<b>66,7</b>	0	0
	RHO	0	0	0	0	0	0	0	<b>100</b>	0
	ESC	3,8	3,8	0	0	0	0	0	0	<b>92,3</b>

#### *5.1.2.2. Réversibilité de la réponse des biomarqueurs chez des poissons provenant d'un site fortement impacté*

Au cours de cette première étude *in situ*, des poissons prélevés sur le REV ont été maintenu 15 jours au laboratoire, en eau non contaminée, afin d'évaluer les cinétiques de réversibilité des biomarqueurs. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 de l'article 5. Ils montrent que les enzymes de biotransformation (*i.e.* activité EROD et GST) retrouvent rapidement une activité basale comparable à celle qui est mesurée en mésocosmes. Sur le REV, ces paramètres apparaissent comme peu intégrateurs de l'exposition à un contaminant et ne pourrait refléter qu'une exposition récente (Wu et al., 2005). Pour la GST, il s'agit là d'un résultat contradictoire avec les observations faites en conditions contrôlées suite à l'exposition au prochloraz montrant alors que les profils de réponses sont dépendant du contexte chimique. Inversement, après 15 jours de dépuration, les paramètres du stress oxydant (*i.e.* GPx et TBARS) n'ont pas atteint leur niveau de base. Ces deux biomarqueurs peuvent donc être considérés comme des paramètres intégrateur de la contamination et de ses effets et permettent alors un échantillonnage moins régulier pour caractériser les effets biologiques de la pollution chez le poisson (Wu et al., 2005).

Les résultats obtenus ici vont dans le sens d'une réponse adaptative à court terme des biomarqueurs. Ils ne peuvent toutefois pas être généralisés puisque les profils de dépuration sont intimement liés à l'exposition préalable des individus aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Par exemple, le profil observé pour l'activité EROD pourrait être lié à une exposition à des contaminants non accumulables et rapidement métabolisés comme les HAPs (Gorbi et Regoli, 2004) ou certains pesticides (Article 3). Ils apportent toutefois une information complémentaire à celle qui est fournie par les expériences de dépuration réalisées en conditions contrôlées et contribuent à une meilleure interprétation des résultats obtenus *in situ*.

#### *5.1.2.3. Première approche des facteurs de variabilité de la réponse des biomarqueurs : influence du sexe et de la saison*

Cette étude préliminaire nous a permis d'appréhender les effets du sexe des poissons et de la saison d'échantillonnage sur les niveaux de base et la réponse des biomarqueurs. Ainsi, en considérant l'ensemble des données, tous les biomarqueurs, à l'exception des TBARS, sont des paramètres dépendant du sexe (Tableau 4 de l'article 5). Afin d'évaluer les différences

entre mâles et femelles indépendamment d'une éventuelle exposition, nous avons recherché ces dernières, uniquement chez les poissons échantillonnés en mésocosmes (Tableau 3 de l'article 5, tableau 5-3). Dans ces conditions seuls la GPx et le GSH au printemps présentent des différences significatives en fonction du sexe des individus. Nos résultats (Tableau 3 de l'article 5) montrent également que l'activité GST varie en fonction de la saison avec une augmentation de celle-ci en automne. De même, la teneur totale en GSH se caractérise par une importante variabilité inter-annuelle (*i.e.* comparaison juin 2003 et juin 2004). Cette variabilité pourrait s'expliquer par différents facteurs tels que la prédation, le parasitisme ou le régime alimentaire (Martinez-Alvarez et al., 2005; Pascual et al., 2003).

**Tableau 5-3 : Résultats d'un test t réalisé, pour chaque biomarqueur, entre les épinoches mâles et femelles échantillonnées en mésocosmes lors des différentes périodes de prélèvements.**

	Printemps 2003 (p)	Printemps 2004 (p)	Automne 2004 (p)
EROD	0,603	0,084	0,835
GST	0,826	0,386	0,551
GPx	0,001	0,001	0,130
GSH	0,041	0,013	0,419
TBARS	0,746	0,831	0,655

Ces résultats indiquent que, comme chez de nombreuses autres espèces, les paramètres biochimiques utilisables comme biomarqueurs chez l'épinoche sont sensibles aux effets de facteurs biotiques et abiotiques (Eggens et al., 1995; Flammarion, 1997; Ronisz et al., 1999). Ces dernières peuvent alors biaiser l'interprétation qui est faite de la réponse des biomarqueurs. Aussi, la caractérisation de la variabilité des biomarqueurs au cours du temps, chez les mâles et chez les femelles apparaît comme un préalable nécessaire à leur application *in situ*.

#### 5.1.4. Conclusion

Cette première étape de notre travail sur le terrain a permis de mettre en avant la faisabilité d'une approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines. D'un point de vue méthodologique, l'épinoche est un poisson qui, sur la zone d'étude considérée, est aisément échantillonné dans des cours d'eau de petite taille, aux niveaux de contamination

variés. De plus, son comportement sédentaire lui confère une spécificité de réponse par rapport à un environnement local contrairement à d'autres espèces (*i.e.* chevaine, gardon, anguille) plus mobiles pour lesquelles il est difficile de lier pression environnementale et réponse des biomarqueurs. Concernant l'utilisation des biomarqueurs chez l'épinoche, ce travail montre que les réponses observées sont en accord avec les données relatives à la contamination du milieu et permettent également de discriminer les sites d'étude. Cette première étude a également permis de mettre en évidence certaines limites des biomarqueurs incluant la réversibilité des réponses et l'interaction avec des facteurs biotiques et abiotiques. Ces conclusions justifient alors pleinement la caractérisation de la variabilité saisonnière des biomarqueurs (Chapitre 5.2) puis de leur position par rapport à d'autres méthodes de surveillance de l'environnement en vue de leur utilisation dans un contexte de biosurveillance (Chapitre 5.3).

## **5.2. ETUDE DE LA VARIABILITE NATURELLE DES BIOMARQUEURS**

### **5.2.1. Objectif**

Il est désormais clairement établi que de nombreux facteurs biotiques et abiotiques incluant l'espèce, le sexe, l'âge, l'état de maturité sexuelle et le parasitisme des individus mais également la température de l'eau et la biodisponibilité de la nourriture, peuvent influencer sur les niveaux physiologiques et la réponse des biomarqueurs (Martinez-Alvarez et al., 2005; Whyte et al., 2000). Ainsi, une bonne connaissance de l'effet de ces facteurs sur les biomarqueurs s'avère indispensable afin de distinguer la part due à la contamination des variations physiologiques normales et de faciliter ainsi l'interprétation des résultats recueillis *in situ*. L'objectif de cette partie de l'étude est donc de caractériser les variations saisonnières des biomarqueurs chez des épinoches échantillonnées sur un site très faiblement contaminé. Les résultats de ce travail devraient alors permettre d'optimiser les conditions de prélèvement en terme de période d'échantillonnage et d'effectif mais également de composition de la batterie de biomarqueurs.

**Tableau 5-4 : Résultats des analyses physico-chimiques réalisées dans l'eau du Vallon du Vivier. Les valeurs présentées sont la valeur minimale et la valeur maximale relevées sur les six prélèvements.**

	Valeurs
Température (°C)	11.3 – 13.1
pH	7.1 – 7.6
Oxygène dissout(mg/L)	8.7 – 11.8
Conductivité (µS/cm)	487 – 526
Dureté (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	160 – 280

**Tableau 5-5 : Résultats des analyses de HAPs et PCBs réalisées dans les sédiments du Vallon du Vivier. Les valeurs présentées sont la valeur minimale et la valeur maximale relevées sur les six prélèvements.**

	Concentrations (µg/kg)
Fluoranthène	150 – 210
Benzo (b) fluoranthène	95 – 120
Benzo (k) fluoranthène	30 – 70
Benzo (a) pyrène	60 – 90
Benzo (g,h,i) pérylène	40 – 65
Indéno (1,2,3,c,d) pyrène	40 – 55
Fluorène	<10
Phénanthrène	70 – 120
Anthracène	10 – 20
Pyrène	120 – 190
Benzo (a) anthracène	60 – 95
Chrysène	75 – 110
Dibenzo (a,h) anthracène	<10 – 15
PCBs <sup>a</sup>	<25

a : Les PCBs n° 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180 ont été recherchés.

### 5.2.2. Choix méthodologiques *a priori*

L'atteinte de l'objectif de cette partie du travail passe par la sélection d'un site faiblement contaminé afin de limiter la part due à la contamination dans les réponses de biomarqueurs mesurées. Ainsi, les poissons ont été échantillonnés sur la station du VDV qui est un site caractérisé par l'absence de source de contamination directe et par un peuplement piscicole non perturbé (Conseil Supérieur de la Pêche, *comm. pers.*). La contamination du site est évaluée tout au long de l'étude en déterminant les concentrations de certains métaux lourds et pesticides dans l'eau mais également de certains HAPs, PCBs et pesticides dans les sédiments.

En raison de l'absence de connaissance quant à la variabilité saisonnière des biomarqueurs chez l'épinoche, il aurait fallu étudier le site sur toute une année avec un pas de temps d'un ou deux mois. La saison hivernale, comprise entre novembre et mars, a toutefois été écartée pour des raisons pratiques<sup>44</sup>. Ainsi, les poissons ont été collectés entre avril et octobre, avec un pas de temps de six semaines.

### 5.2.3. Résultats et discussion

#### 5.2.3.1. Caractérisation chimique et écologique du site sélectionné

D'un point de vue chimique, la qualité physico-chimique de l'eau est bonne comme l'indique les résultats des mesures de pH, température, oxygène dissout mais également de dureté et de conductivité (Tableau 5-4). Force est alors de constater que ces différents paramètres, qui sont généralement influencés par les conditions climatiques, se caractérisent ici par une faible variabilité. Par exemple, la température de l'eau varie entre 11,3 et 13,1°C. Les analyses chimiques réalisées dans l'eau et dans les sédiments confirment la faible contamination de cette station. En effet, parmi les 40 molécules phyto-pharmaceutiques recherchées<sup>45</sup>, aucune n'a été détectée dans l'eau et dans les sédiments. Il en est de même pour les 7 PCBs recherchés dans les sédiments (Tableau 5-5).

---

<sup>44</sup> La capture des poissons est rendue plus difficile en hiver en raison des conditions climatiques. De plus, les conditions météorologiques et l'augmentation du régime hydraulique des cours d'eau ne permettent pas d'effectuer les prélèvements dans des conditions de sécurité compatibles avec la pratique de la pêche à l'électricité.

<sup>45</sup> Les 40 molécules phyto-pharmaceutiques recherchées sont sélectionnées en raison de leur utilisation dans la région d'étude ou de leur classification en qualité de substance prioritaire.

**Tableau 5-6 : Indices hépato, gonado et néphro-somatiques (respectivement HSI, GSI et NSI) et les facteurs de condition (FC) mesurés chez les poissons échantillonnés au cours des différentes périodes. Pour un même paramètre et un même sexe, les valeurs annotées avec des lettres différentes présentent des différences significatives (ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Sidak,  $\alpha = 5\%$ ). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type.**

	Sexe	Avril	Mai	Juin	Août	Septembre	Octobre
HSI	♂	2,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	2,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
	♀	3,6 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	3,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	2,7 $\pm$ 0,7 <sup>a,b</sup>	2,5 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
GSI	♂	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
	♀	3,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	1,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,6 <sup>a,b</sup>	1,4 $\pm$ 0,8 <sup>a,b</sup>
NSI	♂	2,3 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	1,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
	♀	0,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
FC	♂ et ♀	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>



Concernant les métaux lourds, le cadmium et l'étain ne sont pas détectés et les concentrations des autres métaux sont faibles et ne permettent pas de déclasser la rivière (Tableau 5-6). Inversement, plusieurs HAPs sont retrouvés dans les sédiments, avec, pour certains, des concentrations supérieures aux valeurs seuil permettant de déterminer le bon état chimique du milieu (Tableau 5-5). C'est le cas pour le fluoranthène et le benzo (k) fluoranthène.

**Tableau 5-7 : Résultats des analyses de métaux réalisées dans l'eau du Vallon du Vivier. Les valeurs présentées sont la valeur minimale et la valeur maximale relevées sur les six prélèvements.**

	Concentrations (µg/L)
Cadmium	<0,1
Chrome	0,66 – 0,83
Cuivre	<0,5 – 1,3
Plomb	0,17 – 0,65
Nickel	<0,5 – 16,2
Etain	<0,5
Zinc	4,1 – 10,5

Du point de vue écologique, le peuplement piscicole observé sur cette station est conforme à celui attendu selon la classification de Huet (1949) et aux observations réalisées les années précédentes (Conseil Supérieur de la Pêche, *comm. pers.*). En effet, la truite de rivière (*Salmo trutta fario*), le chabot (*Cottus gobio*) et l'anguille qui sont des espèces exigeantes en matière de qualité de l'eau et qui vivent généralement en tête de bassin, sont retrouvées en grand nombre alors que les espèces plus résistantes sont absentes.

#### 5.2.3.2. Description biologique des périodes d'échantillonnage

Nous avons comparé les indices hépato, gonado et néphro-somatiques (respectivement HSI, GSI et NSI) et le FC chez les poissons échantillonnés au cours des différentes périodes (Tableau 5-7). Cette analyse permet de déterminer l'état physiologique des poissons et concourt donc à une meilleure interprétation des niveaux mesurés pour chaque biomarqueur.

**Tableau 5-8 : Valeurs des biomarqueurs mesurées chez les poissons échantillonnés au cours des différentes périodes. Pour un même biomarqueur et un même sexe, les valeurs annotées avec des lettres différentes présentent des différences significatives (ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Sidak,  $\alpha = 5\%$ ). Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type.**

	Sexe	Avril	Mai	Juin	Août	Septembre	Octobre
EROD	♂	6,3 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	6,5 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>
	♀	3,1 $\pm$ 1,0 <sup>a,b</sup>	2,7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	5,3 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	6,9 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	5,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
GST	♂ et ♀	1258 $\pm$ 471 <sup>a</sup>	993 $\pm$ 183 <sup>b</sup>	1175 $\pm$ 355 <sup>a</sup>	1059 $\pm$ 342 <sup>a</sup>	1406 $\pm$ 496 <sup>a</sup>	1247 $\pm$ 362 <sup>a</sup>
GPx	♂	63 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	79 $\pm$ 27 <sup>a,b</sup>	59 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 36 <sup>b</sup>	104 $\pm$ 35 <sup>b</sup>	97 $\pm$ 23 <sup>b</sup>
	♀	126 $\pm$ 45 <sup>a,b</sup>	142 $\pm$ 41 <sup>a</sup>	107 $\pm$ 33 <sup>b</sup>	151 $\pm$ 49 <sup>a</sup>	138 $\pm$ 41 <sup>a,b</sup>	124 $\pm$ 26 <sup>a, b</sup>
GSH	♂ et ♀	37,1 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>	48,8 $\pm$ 14,5 <sup>b</sup>	50,2 $\pm$ 23,9 <sup>a,b</sup>	19,7 $\pm$ 9,7 <sup>c</sup>	31,6 $\pm$ 14,8 <sup>a,c</sup>	24,3 $\pm$ 10,9 <sup>c</sup>
TBARS	♂ et ♀	52 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	43 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	48 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	61 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
AChE	♂ et ♀	84 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 30 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	101 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 23 <sup>a</sup>

Concernant les indices somatiques, les trois paramètres mesurés se caractérisent par des différences très marquées, liées à la saison d'échantillonnage et au sexe des poissons. Brièvement, nous observons, durant les trois premiers mois de l'étude qui correspondent à la phase de reproduction de l'épinoche (Wootton, 1976), des valeurs élevées des NSI chez les mâles explicables par l'hypertrophie du rein et la production de SPG (Borg et al., 1993), ainsi que des valeurs élevées de HSI et de GSI chez les femelles liées à la synthèse hépatique de VTG et à la maturation des ovocytes (Scott et Pankhurst, 1992). En dehors de cette période, aucune différence n'est observée entre les valeurs d'indices somatiques des mâles et des femelles. Les profils de variations observés pour le HSI, le GSI et le NSI sont en accord avec les résultats de plusieurs études précédentes réalisées en mésocosmes (Roussel et al., 2007a) ou en conditions naturelles (Sokolowska et al., 2004). Seul le FC apparaît comme un paramètre indépendant du sexe des individus. De plus, aucune différence entre les périodes d'échantillonnage n'est observée pour ce paramètre. Une tendance qui va dans le sens d'une augmentation au cours des trois premiers mois est toutefois observée. Celle-ci pourrait alors s'expliquer par l'augmentation, durant cette période, de la masse de plusieurs organes déjà mise en évidence par les variations d'indices somatiques (*i.e.* augmentation de la masse du rein chez les mâles, augmentation de la masse du foie et des gonades chez les femelles).

#### 5.2.3.3. Caractérisation des niveaux physiologiques des biomarqueurs

Les valeurs mesurées pour les différents biomarqueurs étudiés lors de chaque période d'échantillonnage sont présentées dans le tableau 5-8. Il est apparu que sur ce site faiblement contaminé, les facteurs sexe et saison, ainsi que leur interaction, restent déterminants dans l'interprétation des résultats (Tableau 5-9). Ils traduisent en effet la variabilité naturelle<sup>46</sup> des biomarqueurs.

L'activité EROD est influencé par le sexe des individus et par la saison d'échantillonnage. En effet, durant la période de reproduction (*i.e.* avril à juin), les femelles présentent une activité EROD significativement plus faible que les mâles. Un phénomène similaire a déjà observé chez différentes espèces de poissons comme le cheveine, le goujon (Flammarion et Garric, 1997) ou encore le flet (Kirby et al., 2004) et pourrait être expliqué par la régulation négative de l'E2 endogène sur les activité catalytiques du cytochrome P450 1A (Arukwe et Goksøyr, 1997). Toutefois, des travaux récents ont montré que la diminution

---

<sup>46</sup> Ici, la variabilité naturelle représente la variabilité non chimique des biomarqueurs, la réponse d'un biomarqueur à un contaminant pouvant aussi être considérée comme naturelle.

de l'activité EROD chez des épinoches exposées à l'EE2, pouvait également être expliquée par un phénomène de dilution protéique en raison de la vitellogenèse (Andersson et al., 2007). En dehors de cette période, les mâles et les femelles présentent des activités EROD similaires. Les valeurs mesurées sont alors en accord avec les activités reportées dans la littérature pour l'épinoche (Holm et al., 1994; Holm et al., 1993) mais également avec celles que nous avons mesurées en conditions contrôlées chez des poissons non exposés (Chapitre 4).

L'activité de la GPx est également un paramètre qui dépend du sexe des individus et de la saison d'échantillonnage. Les poissons mâles présentent une activité GPx plus faible que les poissons femelles mais cette différence, bien que toujours significative, est atténuée lorsque les poissons ne sont pas en période de reproduction avec une augmentation de l'activité GPx mesurée chez les mâles. Si la différence d'activité GPx entre les mâles et les femelles a déjà été observée chez d'autres espèces de poissons comme le poisson chat (*Ameiurus nebulosus*)(Mc Farland et al., 1999) ou la loquette d'Europe (*Zoarces viviparus*)(Ronisz et al., 1999), les fondements biologiques de cette différence ne sont à ce jour pas connus.

Parmi les autres biomarqueurs étudiés, la GST et le GSH présentent des variations qui ne semblent pas être liées au statut reproducteur des poissons. Nous observons en effet une diminution de l'activité GST au mois de mai et une déplétion de la teneur totale en GSH au mois d'août. De même, l'activité GPx des mâles et des femelles apparaît comme significativement inhibée au mois de juin. Ces variations pourraient s'expliquer par l'influence de différents facteurs environnementaux sur la physiologie des poissons. Parmi ces facteurs, la disponibilité de la nourriture est connue pour modifier le statut antioxydant des organismes comme mis en évidence dans une étude antérieure qui révélait une déplétion en GSH et des perturbations des activités des enzymes antioxydantes chez des dorades royales maintenues 46 jours avec une restriction de nourriture (Pascual et al., 2003). Outre la disponibilité de la nourriture, la qualité de celle-ci apparaît aussi comme un facteur de variabilité important. La teneur en lipides et en vitamines influence en effet les mécanismes de protection contre le stress oxydant comme indiqué par plusieurs études qui mettent en avant les effets protecteurs d'une nourriture riche en lipides et en vitamines (Mourente et al., 2000; Mourente et al., 2002). La physico-chimie de l'eau est également susceptible d'influer sur les niveaux de base des biomarqueurs plus particulièrement ceux impliqués dans la protection contre le stress oxydant au travers des variations de la concentration en oxygène dissout (Cooper et al., 2002; Lushchak et al., 2005; Lushchak et al., 2001) ou de température (Lushchak et Bagnyukova, 2006a,b). Toutefois, au regard de la faible variabilité des

paramètres physico-chimiques suivis sur le site, il semble peut probable que ces derniers puissent influencer significativement sur les niveaux des biomarqueurs. Contrairement aux paramètres présentés ci-dessus, la teneur en TBARS n'est pas soumise à la variabilité saisonnière pendant la période étudiée (*i.e.* avril à octobre). Ce résultat montre que, malgré les fluctuations des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, les poissons ne subissent pas de dommages oxydants au niveau des macromolécules que sont les lipides et fait apparaître les TBARS comme un biomarqueur robuste pour l'étude des effets du stress oxydant *in situ*.

L'activité AChE semblent également être un biomarqueur peu sensible aux variations saisonnières. Ce résultat est en accord avec les conclusions des travaux de (Sturm et al., 1999) sur la caractérisation des cholinestérases chez l'épinoche. Les auteurs mettent en évidence l'absence d'effet de la période d'échantillonnage sur les activités cholinestérases d'épinoches prélevées en juillet et en octobre. Ils mettent également en évidence une absence de sensibilité aux variations de température bien que ce paramètre soit connu comme l'un des principaux facteurs influant sur les cholinestérases (Bocquené et Galgani, 1998). Ce résultat est imputable aux faibles variations de la température de l'eau enregistrées sur le terrain (Sturm et al., 1999).

Concernant les marqueurs de la perturbation endocrinienne (*i.e.* VTG et SPG), les niveaux de base ne sont pas détectés et ceci quelque soit la période d'échantillonnage. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisé sur la mise en évidence des effets œstrogéniques en mesurant l'induction de la VTG chez les mâles et des effets androgéniques en mesurant l'induction de la SPG chez les femelles. Les individus étudiés possèdent donc le matériel génétique nécessaire à la synthèse de VTG ou de SPG mais ces protéines ne sont généralement pas exprimées ou le sont très faiblement comme cela a été décrit pour la VTG chez de nombreuses espèces (Harries et al., 1997; Sumpter et Jobling, 1995; Tyler et al., 1998).

#### **5.2.4. Conclusion**

En raison de la large contamination des milieux aquatiques, il semble illusoire de chercher à établir une référence absolue s'appliquant aux variables biologiques que sont les biomarqueurs. La recherche d'une référence pragmatique apparaît alors comme plus indiquée. Dans ce domaine, l'épinoche offre un avantage clair par rapport à d'autres espèces plus classiquement utilisées pour la surveillance des milieux aquatiques telles que le cheveine, le

gardon ou le goujon. Cette espèce est en effet retrouvée aussi bien dans des zones fortement contaminées que sur des sites non anthropisés, permettant ainsi la définition d'une référence pragmatique aussi proche que possible d'une référence absolue.

**Tableau 5-9 : Valeurs basales de référence déterminées, pour les différents biomarqueurs étudiés, chez des épinoches mâles et femelles échantillonnées au sein de l'hydro-écorégion des " tables calcaires " pendant et après la période de reproduction. Les données sont présentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type.**

	Sexe	Reproduction	Hors reproduction
EROD	♂	5.3 ± 1.7	6.2 ± 2.1
	♀	3,0 ± 1.5	
GST	♂ et ♀	1236 ± 396	
GPx	♂	68 ± 22	95 ± 35
	♀	135 ± 41	
GSH	♂ et ♀	32.7 ± 15.9	
TBARS	♂ et ♀	49.5 ± 22	
AChE	♂ et ♀	93 ± 26	
VTG	♂	<256 ng/mL	
SPG	♀	<0,25 U/mL	

Les analyses chimiques réalisées dans l'eau et dans les sédiments du site du VDV ont montré le caractère faiblement contaminé de cette station, renforçant ainsi la pertinence de ce choix pour la définition des niveaux de base des biomarqueurs. Ce travail a été complété par la caractérisation biologique des périodes d'échantillonnage, ce qui a permis d'évaluer le statut reproducteur et l'état général des poissons prélevés. Des valeurs de référence ont ainsi pu être établies en prenant en compte, autant que possible, le statut physiologique de l'épinoche (Tableau 5-10). Ces valeurs possèdent toutefois leurs limites, principalement géographiques. Elles sont en effet le fruit d'un travail réalisé sur un seul et unique site au sein de l'hydro-écorégion des " tables calcaires " (Wasson et al., 2002). Aussi, s'il peut aisément être admis que ces valeurs de référence puissent être utilisées en tant que telle sur cette région, l'extension de leur zone de validité nécessite des études complémentaires réalisées dans d'autres hydro-écorégions.

### **5.3. POSITION D'UNE BATTERIE DE BIOMARQUEURS PAR RAPPORT A D'AUTRES MESURES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES**

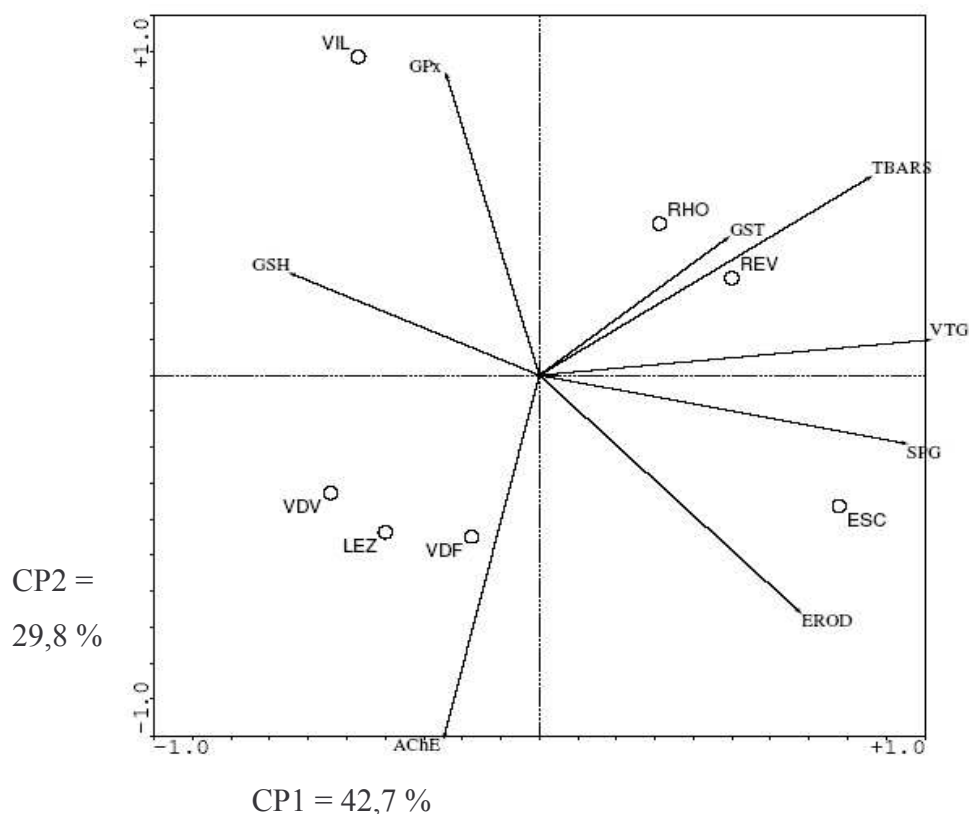
#### **5.3.1. Objectif**

Outre la mesure des biomarqueurs, d'autres données, chimiques et biologiques, qui rendent compte de la contamination du milieu et de la perturbation des organismes qui y vivent, peuvent être collectées sur les différents sites. Ces données sont alors susceptibles d'être mises en relation. Même si la comparaison de données aussi différentes par nature que marqueurs biochimiques, indices somatiques, FC, IPR, contamination chimique de l'eau et des sédiments, pressions environnementales... ne peut certainement pas permettre l'établissement d'un lien entre expositions et effets, elle permet toutefois une meilleure caractérisation des sites reposant sur des informations chimiques et biologiques.

#### **5.3.2. Résultats et discussion**

##### *5.3.2.1. Réponse d'un ensemble cohérent de biomarqueurs*

Ce dernier volet de notre travail *in situ* repose sur la mesure de 8 biomarqueurs sur 7 sites présentant des contaminations qualitativement et quantitativement différentes (tableau 4 de l'article 6). L'analyse des résultats obtenus au cours de cette campagne sur la station VDV montre que les données ne sont pas significativement différentes des valeurs de référence précédemment établies et contribue donc à la validation de ces dernières. Pour les autres sites déjà étudiés (*i.e.* REV, LEZ, ESC et RHO), les profils de réponses observées au cours de cette campagne sont similaires à ceux déjà décrits. Ils sont toutefois complétés par la mesure de l'activité AChE et par le dosage de la VTG et de la SPG. Ces trois dosages révèlent des effets neurotoxiques (*i.e.* REV, ESC et RHO) et l'exposition éventuelle à des perturbateurs endocriniens œstrogène (*i.e.* REV, ESC et RHO) et androgéno-mimétiques (*i.e.* ESC et RHO). Pour les autres sites (*i.e.* VIL et VDF), les réponses observées sont cohérentes avec les pressions environnementales rencontrées sur les sites et les données disponibles quant à la réponse des biomarqueurs (Article 6).



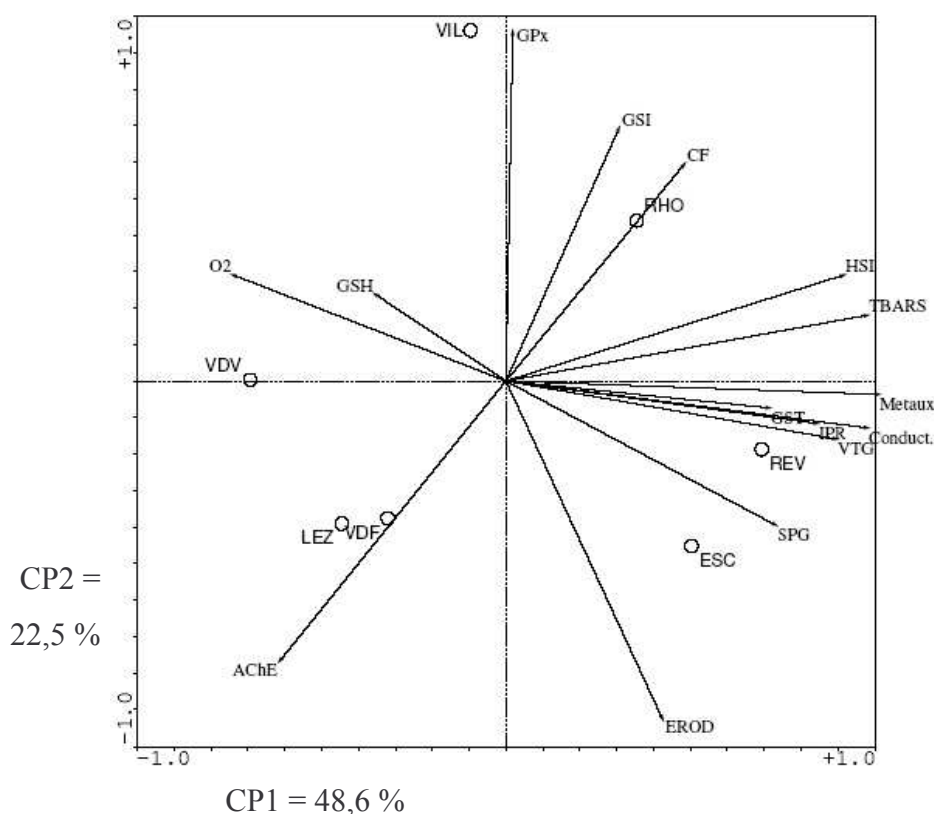
**Figure 5-1 : Analyse en Composantes Principales des résultats obtenus pour les 8 biomarqueurs étudiés et représentation des sites sur le premier plan factoriel.**

Les résultats obtenus peuvent être présentés sur le premier plan factoriel d'une analyse en composantes principales (ACP ; Figure 5-1). Le premier axe qui explique 42,7% de la variance totale, est corrélé aux marqueurs de la perturbation endocrinienne. Le deuxième axe qui explique 29,8% de la variance totale est positivement corrélé à la GPx et négativement corrélé à l'AChE. La disposition de ces biomarqueurs sur les deux premiers axes met alors en évidence la complémentarité de ces paramètres biochimiques. Inversement, certains marqueurs apparaissent comme corrélés. C'est le cas de la GST et des TBARS mais également de la VTG et de la SPG. Au regard de la spécificité de leur réponse, il semble toutefois injustifié de chercher à réduire le nombre de biomarqueurs à utiliser sur la seule base de leurs corrélations. L'illustration des sites sur le premier plan factoriel formé par les 8 biomarqueurs permet de distinguer 4 groupes de stations. Les sites faiblement impactés (*i.e.* LEZ, VDV et VDF) sont négativement corrélés aux deux axes, ESC est lié à la première composante du fait de l'induction d'EROD et de la perturbation endocrinienne, alors que VIL est lié à la deuxième composante en raison de l'impact du stress oxydant. Pour leur part, REV et RHO ont une position intermédiaire par rapport à la partie positive des deux axes qui est expliquée par l'induction des TBARS mais aussi par celle de l'EROD et des marqueurs de la perturbation endocrinienne.



### 5.3.2.2. Relation avec la qualité du milieu

Conjointement à la mesure des biomarqueurs, la qualité du milieu a été évaluée par la mesure de paramètres physico-chimiques et des concentrations métalliques dans l'eau (Tableaux 2 et 3 de l'article 6). La conductivité et la concentrations en oxygène dissout qui sont considéré comme les paramètres physico-chimiques parmi les plus pertinents pour décrire l'état du milieu (Sanchez et al., 2007) ainsi qu'un indice métaux (Flammarion, 1997) peuvent alors être insérées dans une ACP (Figure 5-2) aux côtés des résultats obtenus pour les biomarqueurs mais également de paramètres physiologiques (*i.e.* HSI, GSI, FC) et écologiques (*i.e.* IPR, voir paragraphe 5.3.2.3).



**Figure 5-2 : Analyse en Composantes Principales des résultats obtenus pour les 8 biomarqueurs étudiés et les variables environnementales mesurées accompagnée de la représentation des sites sur le premier plan factoriel.**

Les paramètres physico-chimiques sont corrélés à la première composante, positivement pour la conductivité et l'indice métaux, négativement pour la teneur en oxygène. On retrouve aussi sur la partie positive de cette composante les marqueurs de la perturbation endocrinienne et les TBARS. La superposition des sites sur le premier plan factoriel montre que les sites REV et ESC sont liés à la première composante. Les sites faiblement impactés (*i.e.* LEZ, VDV et VDF) se retrouve sur la partie négative des deux premières composantes, intimement liés à la

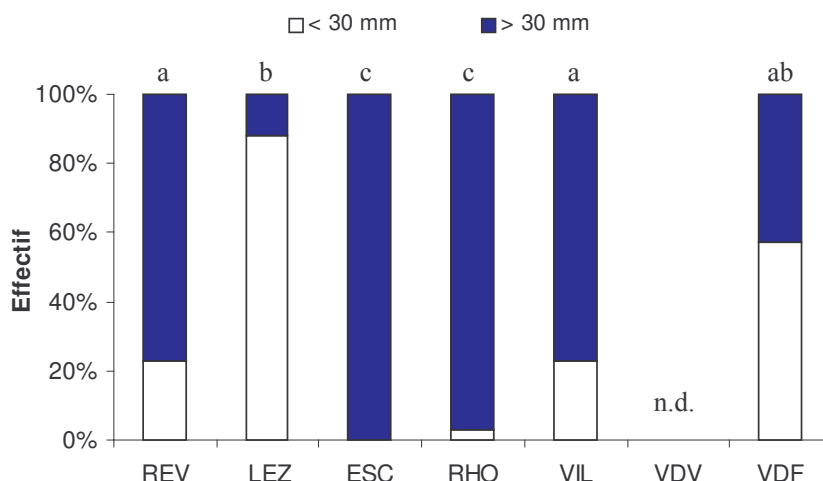
concentration en oxygène et aux fortes valeurs de GSH et d'AChE. Les données recueillies en terme de chimie restent incomplètes et ne permettent pas une description exhaustive de la qualité du milieu. Elles montrent cependant la complémentarité entre l'approche chimique et la mesure de biomarqueurs biochimiques chez l'épinoche.

#### 5.3.2.3. Relation avec des mesures d'ordre écologique

Le peuplement piscicole présent sur les 7 sites a également été étudié. Le descripteur utilisé est alors l'IPR (Oberdorff et al., 2002) qui est positivement corrélé à la première composante de l'ACP (Figure 5-2). Le site du REV présente un peuplement piscicole fortement perturbé caractérisé par l'absence des espèces propres aux zones amonts des cours d'eau (chabot, viron, ...). Les stations ESC et RHO présentent pour leur part une population de poissons moyennement perturbée avec la quasi absence d'espèces sensibles à l'instar des espèces tolérantes. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec les résultats obtenus pour les biomarqueurs. Ces trois stations présentent en effet une forte réponse des biomarqueurs et se caractérisent par l'induction des marqueurs de la perturbation endocrinienne. Inversement, les stations LEZ et VDV ont un peuplement piscicole peu perturbé, constitué d'espèces sensibles et caractéristiques alors que les biomarqueurs présentent peu de réponses significatives. En ce qui concerne les populations de poissons, de nombreux facteurs liés aux conditions d'habitat peuvent expliquer les déséquilibres observés et tout ne peut pas être imputé à la contamination du milieu responsable de la réponse des biomarqueurs comme en témoigne les résultats obtenus sur les sites VIL et VDF (Article 6).

Au sein de la communauté piscicole, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés aux épinoches en analysant la structure de taille de cette population sur la base de classes de 1 cm. Les stations REV et VDF ont une population d'épinoches dans laquelle les différentes classes de taille sont représentées, mais cela n'est pas vrai sur les autres stations. Pour faciliter l'interprétation de ces résultats, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Jones et Hynes (1950) pour créer seulement deux classes. La première regroupe tous les individus dont la taille est inférieure à 30 mm ce qui correspond aux poissons nés dans l'année et qui ne se sont pas reproduits. La seconde rassemble alors les individus dont la taille est supérieure à 30 mm ce qui représente les poissons de 1 an et plus c'est à dire les poissons qui se sont reproduits au cours de l'année (Figure 5-3). Sur VDF, la distribution des épinoches est équilibrée avec la prévalence de la cohorte des poissons de moins de 1 an qui traduit un bon recrutement, et la présence des individus plus âgés dans différentes classes de taille. La population de la LEZ est

fortement déséquilibrée en faveur de la cohorte des poissons de moins de 1 an. Ce résultat reflète le bon recrutement sur cette station associé à la disparition des poissons plus âgés après la reproduction : un phénomène documenté chez l'épinoche (Wootton, 1976). Sur ces deux stations, ces résultats sont à mettre en regard des niveaux de contamination et des réponses biochimiques chez l'épinoches qui sont faibles.



**Figure 5-3 : Distribution des épinoches de moins de 1 an (<30mm) et de plus de 1 an (>30mm) sur les différentes stations étudiées. Les données sont présentées en fréquence relative. Les stations annotées avec des lettres différentes présentent une différence significative (test de Chi-2,  $p < 0.05$ ). n.d. : distribution non déterminée en raison des faibles effectifs.**

Sur les autres sites étudiés et qui se caractérisent par des contaminations qualitativement et quantitativement différentes mais également par des réponses biochimiques chez l'épinoche importantes, nous pouvons observer un déséquilibre de la population d'épinoche en faveur des poissons de plus de 1 an. Ce déséquilibre est très marqué sur les stations ESC et RHO. Si dans le premier cas, il pourrait être imputable à la méthode d'échantillonnage mise en œuvre, ce déséquilibre pourrait aussi indiquer un effet populationnel en lien avec la perturbation endocrinienne. La confirmation de cette hypothèse nécessite la mise en œuvre d'études complémentaires passant par la validation des classes de taille établies et par la recherches d'autres signes de perturbation (*e.g.* sex-ratio, atteintes histologiques).

### 5.3.3. Conclusion

Le fait d'avoir pu recueillir, sur les mêmes sites, des informations relatives à la qualité chimique du milieu et des informations concernant différents niveaux d'organisation biologique a permis la discussion de liens éventuels entre les biomarqueurs et ces différentes variables. Le lien entre qualité du milieu et réponse des biomarqueurs semble être relativement clair. Inversement, il est apparu difficile de mettre en évidence un lien entre la

réponse des biomarqueurs et les effets au niveau des populations ou de la communauté piscicole. Les différentes données recueillies apparaissent toutefois comme complémentaires et contribuent à une meilleure caractérisation de la contamination des milieux et de ses effets. Elles pourraient alors être complétées par des informations relatives à d'autres niveaux d'organisation en intégrant par exemple des données histologiques.

## Chapitre 6 : Vers un outil de synthèse des données

### 6.1. OBJECTIF

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5, les études *in situ* basées sur la mesure d'une batterie de biomarqueurs génèrent une quantité importante de données qu'il est difficile de représenter d'une manière globale et synthétique. Ainsi, à l'image des travaux réalisés autour du développement et de la validation d'indice « biomarqueurs » (Beliaeff et Burgeot, 2002; Broeg et al., 2005; Chèvre et al., 2003a; Narbonne et al., 1999), nous avons cherché à développer un outil de synthèse des données qui puisse prendre en compte les différentes contraintes inhérentes à notre travail.

### 6.2. PRINCIPE ET METHODE DE CALCUL

#### 6.2.1. Loi normale et probabilité

La loi normale, également appelée loi de Gauss est la loi statistique la plus répandue. Son expression mathématique est la suivante :

$$n(x) = \frac{n}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

où  $n$  représente le nombre total d'individus dans l'échantillon,  $n(x)$  représente le nombre d'individus pour lesquels la grandeur analysée a la valeur  $x$ ,  $\mu$  représente la moyenne et  $\sigma$  représente l'écart-type. La représentation graphique qui en découle est présentée sur la figure 6-1.

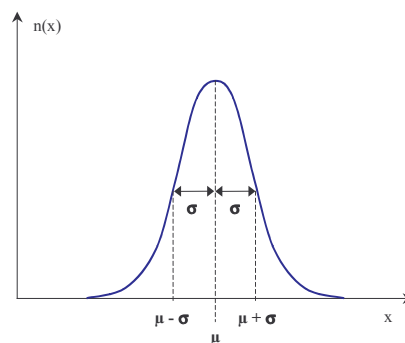
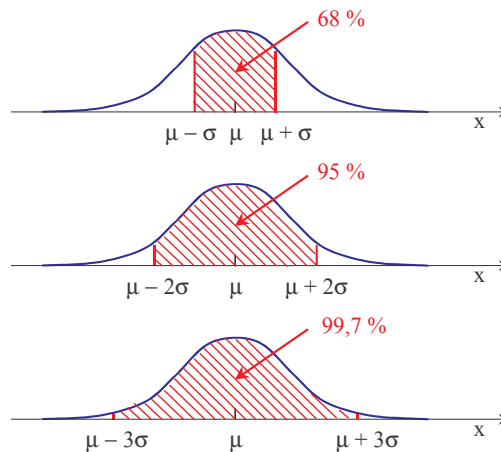


Figure 6-1 : Représentation graphique de la loi normale.

Afin de calculer les probabilités associées à la loi normale, on recourt généralement à la loi normale centrée réduite qui présente les mêmes propriétés graphiques que la loi normale générale mais pour laquelle  $\mu = 0$  et  $\sigma = 1$ . Il est alors possible de déterminer, pour cette loi, la probabilité qu'une variable  $x$  s'écarte de la moyenne  $\mu$  de plus de  $z_0 \cdot \sigma$  en appliquant la relation suivante :

$$z_0 = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Il en résulte alors que, pour un échantillon caractérisé par une distribution normale, 68% des individus sont compris dans l'intervalle  $\mu - \sigma$  et  $\mu + \sigma$ , 95% des individus sont compris dans l'intervalle  $\mu - 1,96\sigma$  et  $\mu + 1,96\sigma$ , et 99,7% des individus entrent dans l'intervalle  $\mu - 3\sigma$  et  $\mu + 3\sigma$  (Figure 6-2).



**Figure 6-2 : Représentation de la probabilité d'écart à la moyenne en fonction de l'écart-type ( $\sigma$ ) pour des échantillons présentant une distribution normale.**

### 6.2.2. Méthode de calcul

Afin de pouvoir utiliser les principes précédemment énoncés, les données doivent présenter une distribution normale ou s'en approcher. Ainsi, dans une première étape, les données sont log-transformées selon la relation suivante :

$$Y_i = \log\left(\frac{X_i}{\overline{X_0}}\right)$$

où  $X_i$  est la valeur mesurée pour un biomarqueur chez un individu prélevé sur un site donné et  $\overline{X_0}$  est la moyenne calculée pour un biomarqueur sur des données utilisées comme référence. Sur les données log-transformées, il devient alors possible d'appliquer les règles mathématiques qui régissent la loi normale centrée réduite et donc de décrire la position de

chaque échantillon par rapport à la moyenne générale de la population considérée en déterminant le paramètre  $Z_i$  pour chaque individu selon la relation suivante :

$$Z_i = \frac{Y_i - \mu}{\sigma}$$

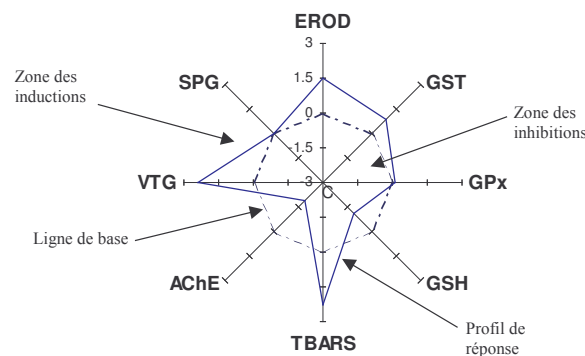
Afin de créer une ligne de base de valeur 0 et de représenter la déviation des biomarqueurs mesurés sur un site par rapport à la déviation calculée pour les données de référence, un paramètre  $A_i$  est déterminé pour chaque biomarqueur sur un site donné selon l'équation suivante :

$$Ai = \overline{Z_i} - \overline{Z_0}$$

où  $\overline{Z_0}$  représente la moyenne des valeurs de  $Z_i$  calculée pour les valeurs de référence de chaque biomarqueur.

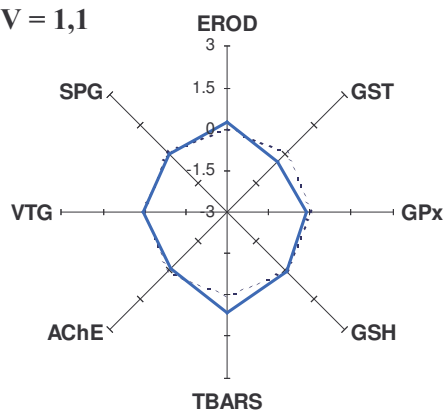
Les valeurs de  $A_i$  calculées pour les différents biomarqueurs sur un site donné sont alors reportées sur un graphique en étoile qui représente alors les variations, aussi bien positives que négatives, des différents biomarqueurs mesurés sur un site par rapport aux valeurs de référence normalisées (Figure 6-3). Une valeur numérique d'indice "biomarqueurs" (IB), spécifique de chaque site et qui représente la somme des effets observés sur le site considéré, est également calculée selon l'équation suivante :

$$IB = \sum |Ai|$$

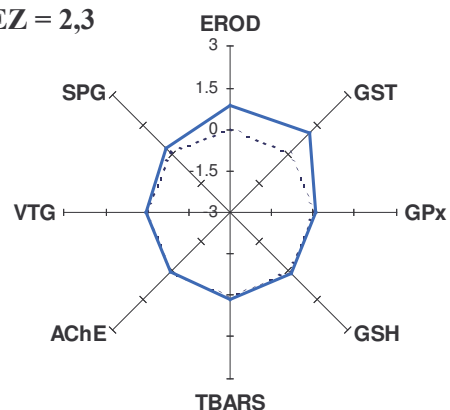


**Figure 6-3 : Représentation graphique de l'indice biomarqueur. Le profil de réponse représenté est celui d'un site caractérisé par une induction de l'EROD, de la GST, des TBARS et de la VTG mais aussi par une inhibition de la teneur en GSH et de l'AChE et une absence d'effet pour la GPx et la SPG.**

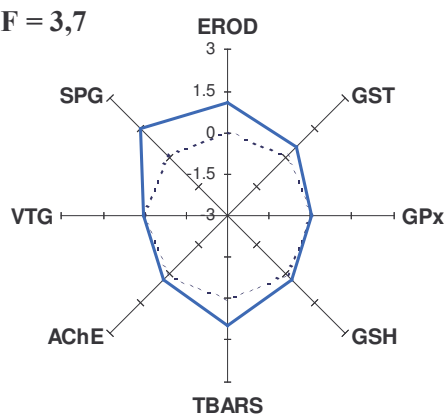
**VDV = 1,1**



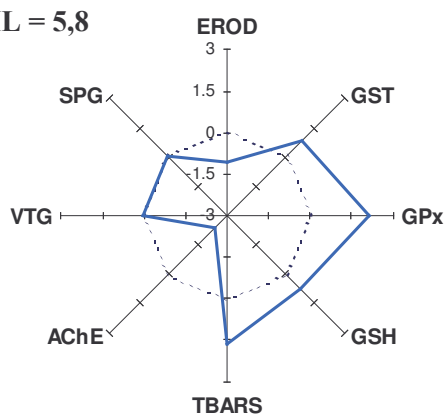
**LEZ = 2,3**



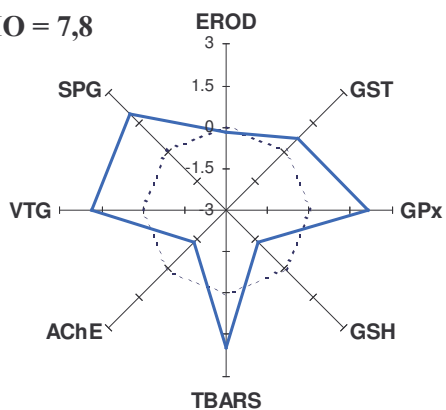
**VDF = 3,7**



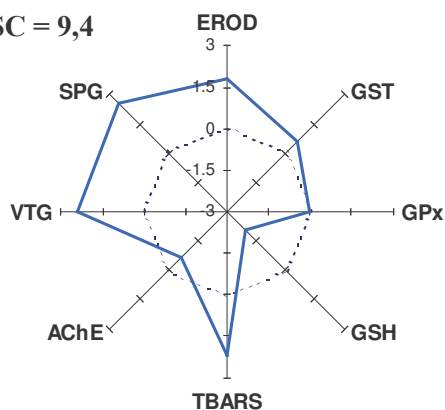
**VIL = 5,8**



**RHO = 7,8**



**ESC = 9,4**



**REV = 10,3**

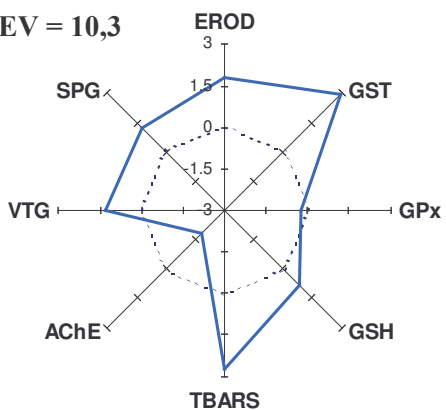


Figure 6-4 : Présentation des indices “biomarqueurs” calculés pour les stations de l’étude.



## 6.3. RESULTATS

L'IB a été calculé pour les données présentées dans l'article 6. Les résultats sont présentés sur la figure 6-4. En comparant le score calculé pour chaque biomarqueur sur chacun des sites étudiés, force est de constater que la méthode de calcul développée permet de restituer fidèlement la réponse des biomarqueurs en terme d'induction et d'inhibition mais également en terme d'intensité des réponses. De plus, dans notre étude, cet outil mathématique permet de discriminer les sites échantillonnés sur la base de la valeur de l'IB. Certains sites présentent toutefois des IB proches (*e.g.* ESC (9,4) et REV (10,3) ou VDV (1,1) et LEZ (2,3)) et dans ce cas, la discrimination peut être complétée par le graphique accompagnant l'IB qui représente les variations mesurées pour chaque paramètre.

Le traitement de ces données soulèvent plusieurs interrogations quant à la mise en œuvre pratique de l'IB.

### 6.3.1. Sélection de la ligne de base

La méthode de calcul développée ici repose sur la projection de données centrées-réduites par rapport à une valeur de référence. Le choix du jeu de données nécessaire à la détermination de cette valeur est donc susceptible d'influer sur la valeur de l'IB et à terme sur le diagnostic de l'état des cours d'eau. Ainsi, deux options peuvent être considérées.

- L'utilisation d'une référence interne à l'étude qui serait le site le moins anthropisé. Dans le cadre de notre travail, la station VDV pourrait alors être considérée comme telle.
- L'utilisation de valeurs de référence moyennes établies sur la base des connaissances de la variabilité naturelle des biomarqueurs. Les valeurs déterminées dans le chapitre 5.2 peuvent alors être prise en considération.

Les résultats obtenus en utilisant ces deux méthodologies sont présentés dans le tableau 6-1. Les valeurs obtenues pour chaque condition sont peu différentes et le classement des sites n'est pas modifié en fonction de la méthode choisie. L'utilisation de valeurs de référence moyennes permet toutefois de calculer un IB pour l'ensemble des sites étudiés et de représenter les éventuelles variations, naturelles ou anthropiques, de la réponse des biomarqueurs mesurées sur un site faiblement contaminé. Aussi, dans le cadre de ce travail, nous avons fait le choix d'utiliser les valeurs de références établies dans le chapitre 5.2 pour construire la ligne de base.

**Tableau 6-1 : Valeurs de l'indice « biomarqueurs » en fonction des valeurs utilisées pour la constitution de la ligne de base.**

	Ligne de base	
	Référence interne	Valeurs de référence moyennes
VDV	-	1,1
LEZ	2,7	2,3
VDF	3,8	3,7
VIL	6,1	5,8
RHO	8,1	7,8
ESC	9,2	9,4
REV	10,0	10,3

### 6.3.2. Quel poids pour chaque biomarqueur ?

L'IB développé dans ce travail agrège les résultats obtenus pour 8 biomarqueurs. Malgré leur complémentarité, plusieurs biomarqueurs décrivent un même phénomène physiologique (*i.e.* EROD et GST pour la métabolisation des xénobiotiques, GPx, GSH et TBARS pour le stress oxydant, VTG et SPG pour la perturbation endocrinienne). Il est alors légitime de s'interroger sur l'éventuelle nécessité de pondérer les résultats des biomarqueurs afin de ne pas favoriser la part d'un effet dans la valeur finale de l'IB.

Dans ce travail, nous avons fait le choix de pondérer les marqueurs du stress oxydant de telle sorte que ce phénomène est un poids identique à celui des autres biomarqueurs<sup>47</sup>. En effet, GPx, GSH et TBARS sont intimement liés et leurs réponses peuvent être affectées par les mêmes contaminants selon un mécanisme intégré (Figure 2-3). Les IB calculés avec et sans pondération sont présentés dans le tableau 6-2. Ces résultats montrent alors que la pondération des paramètres du stress oxydant va conduire à une meilleure discrimination des sites. En effet, les IB calculés, sans pondération, pour les trois stations les plus impactées (*i.e.* RHO, ESC et REV) varient dans une plage de valeur de 1,3 alors qu'ils varient sur une plage de valeur de 2,5 suite à la pondération des marqueurs du stress oxydant. Toutefois, la pondération ne modifie pas, dans cette étude, le classement des sites.

<sup>47</sup> Cela revient à une division par 3 des valeurs de A<sub>i</sub> calculées pour la GPx, le GSH et les TBARS.

**Tableau 6-2 : Valeurs de l'indice "biomarqueurs" en fonction de la pondération des différents biomarqueurs.**

	Indice "biomarqueurs"	
	Sans pondération	Avec pondération
VDV	1,6	1,1
LEZ	2,5	2,3
VDF	4,6	3,7
VIL	8,8	5,8
RHO	11,5	7,8
ESC	12,3	9,4
REV	12,8	10,3

### 6.3.3. Dépendance de l'indice "biomarqueurs" par rapport à l'échantillonnage

Du fait de l'utilisation d'une normalisation centrée réduite pour le calcul de l'IB, les valeurs obtenues pour ce dernier sont susceptibles de varier en fonction du jeu de données utilisé. Pour évaluer l'impact de ce phénomène sur le résultat final de l'IB, nous avons créé deux jeux de données comprenant les valeurs de référence ainsi que les stations VDV, LEZ, VDF et VIL dans un cas (jeu de données A) et les stations VIL, RHO, ESC et REV dans l'autre cas (jeu de données B). Les IB ainsi calculés sont présentés dans les tableaux 6-3A et 6-3B. La comparaison avec les IB calculés en utilisant l'intégralité des sites (Figure 6-4) confirme que les valeurs de l'IB dépendent du jeu de données utilisé.

**Tableau 6-3 : Valeurs de l'indice "biomarqueurs" calculé pour deux jeux de données différents comprenant les valeurs de références et 4 sites choisis parmi les 7 initialement échantillonnés. Les valeurs entre parenthèses sont les IB obtenus en utilisant l'ensemble des données.**

A	Stations considérées	Indice "biomarqueurs"	
	VDV	1,6	(1,1)
	LEZ	3,3	(2,3)
	VDF	5,4	(3,7)
	VIL	7,3	(5,8)

B	Stations considérées	Indice "biomarqueurs"	
	VIL	5,4	(5,8)
	RHO	7,5	(7,8)
	ESC	8,4	(9,4)
	REV	9,3	(10,3)

Nous constatons, pour le jeu de données A une augmentation des valeurs de l'IB par rapport aux valeurs attendues. Ainsi, la station VDF qui se caractérise par une faible réponse des biomarqueurs, présente un IB de 5,4 initialement obtenu pour des site modérément impacté. De même, la station VIL qui présente un réponse modérée des biomarqueurs obtient un IB de

7,3 qui correspond, pour les données initiales, à un site fortement impacté tel que RHO. Un effet similaire est observé pour le jeu de données B mais de manière moins importante du fait de la présence de valeurs de référence et de valeurs très éloignées de cette référence dans les données utilisées. Au regard de ces résultats, les valeurs de l'IB ne peuvent être considérées comme un descripteur quantitatif du niveau d'impact des biomarqueurs. Elles constituent toutefois un indicateur semi quantitatif permettant le classement des sites les uns par rapport aux autres sur la base de la réponse des biomarqueurs. En effet, le classement des stations ainsi que la forme de la représentation graphique ne sont pas affectés par les modifications du jeu de données<sup>48</sup>.

#### **6.3.4. Position de l'indice “ biomarqueurs ” par rapport à d'autres indices chimiques et écologiques**

A l'image du travail présenté dans le chapitre 5.3 de ce manuscrit qui consistait à évaluer la position d'une batterie de biomarqueurs par rapports aux descripteurs chimiques et écologiques, il est possible d'évaluer la position de l'IB par rapport aux autres indices contribuant à l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques. Les données collectées pour les différentes stations ainsi que les IB calculés sont présentés dans le tableau 6-4. En raison du faible nombre de points, nous ne nous risquons pas à déterminer une relation mathématique entre les différents indices. Toutefois, une analyse critique des données montrent que l'IB fournit une information cohérente avec les indices de qualité chimique du milieu (SEQ-Eau et indice métaux). *A contrario*, l'IB ne va pas systématiquement dans le même sens que l'IPR, un résultat qui peut s'expliquer par le fait que l'IPR, comme les autres indices écologiques, sont influencés par divers paramètres non chimiques liés à la qualité de l'habitat.

---

<sup>48</sup> Les données de chaque site sont en effet toujours représentées par rapport aux mêmes données de référence.

**Tableau 6-4 : Comparaison pour les sites étudiés des indices “ biomarqueurs ” avec les indices de qualité chimique et écologique du milieu.**

	Indice “ biomarqueurs ”	SEQ-Eau <sup>a</sup>	Indice métaux	IPR
VDV	1,1	1	1,3	3,73
LEZ	2,3	2	1,5	12,98
VDF	3,7	n.d.	1,5	20,41
VIL	5,8	n.d.	1,8	14,72
RHO	7,8	4	2,3	20,07
ESC	9,4	4	2,8	18,49
REV	10,3	n.d.	2,5	43,17

<sup>a</sup> Indice issu du Système d’Evaluation de la Qualité de l’Eau avec 1 = eau de très bonne qualité et 5 = eau de mauvaise qualité.

## 6.4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les études basées sur l’utilisation d’une batterie de biomarqueurs génèrent une importante quantité de données. Le recours à des indices permettant une agrégation cohérente de ces données permet d’exploiter ces dernières dans un objectif de gestion de l’environnement (Beliaeff et Burgeot, 2002; Chèvre et al., 2003a; Narbonne et al., 1999). La méthode développée dans le cadre de ce travail de thèse présente plusieurs avantages.

- La valeur de l’IB qui reflète l’intensité des effets mesurés pour les différents biomarqueurs est associée à une représentation graphique simple qui permet de visualiser ces effets. Des stratégies similaires ont été développées par Beliaeff et Burgeot (2002) et par Chèvre et al. (2003a) qui ont respectivement eu recours à une représentation en étoile ou à des histogrammes afin de représenter les résultats. Ces différents modes de représentation permettent alors la comparaison visuelle des sites y compris ceux qui ont des IB identiques ou proches (Beliaeff et Burgeot, 2002). Ainsi, la spécificité de chaque biomarqueur peut être prise en compte dans l’interprétation finale des résultats.

- Des travaux étudiant la réponse d’une batterie de biomarqueurs chez des mollusques et des poissons marins ont mis en avant l’importance de disposer de valeurs de référence afin de comparer les valeurs d’IB calculées pour différents sites (Bresler et al., 1999). La méthode de calcul développée ici s’attache donc à comparer les valeurs obtenues sur chaque station à des valeurs de référence préalablement déterminées. Cette stratégie, unique pour ce qui est du calcul des IB, est similaire à celle mise en œuvre pour le calcul

d'indices biocénétiques tel que l'IPR qui mesure l'écart entre le peuplement piscicole observé et un peuplement piscicole de référence (Oberdorff et al., 2002).

▪ A l'instar des méthodes précédemment décrites qui considèrent que les biomarqueurs sélectionnés peuvent uniquement être induits (*e.g.* activité EROD) ou inhibés (*e.g.* AChE) (Beliaeff et Burgeot, 2002; Blaise et al., 2002; Broeg et al., 2005; Chèvre et al., 2003a; Narbonne et al., 1999), la méthode développée au cours de ce travail offre la possibilité de prendre en compte mais également de représenter, pour un même biomarqueur, les phénomènes d'activation et d'inhibition. En effet, si l'inhibition de l'activité EROD et l'activation de l'AChE sont des phénomènes rarement observés *in situ* et qui pourraient être négligés par rapport à l'induction de l'activité EROD et l'inhibition de l'AChE (Flammarion, 1997), il n'en va de même pour d'autres biomarqueurs, particulièrement ceux liés au stress oxydant<sup>49</sup>. La méthodologie mise en œuvre ici permet alors d'appréhender plus rigoureusement les effets de la contamination sur les organismes et de considérer la complexité de ces mécanismes dans l'évaluation de la qualité du milieu.

Outres les avantages présentés ci-dessus, l'IB développé au cours de ce travail possède aussi ses limites.

▪ En effet, le recours à une normalisation centrée réduite qui permet de comparer des biomarqueurs aux échelles de réponse différentes, rend la valeur de l'IB dépendante du jeu de données. Cette observation a des implications fortes en terme d'utilisation puisque les sites ne peuvent rigoureusement être comparés que lorsqu'ils sont traités au sein d'un même tableau de données. Cela revient donc à recalculer chaque année les IB fournit les années précédentes afin de pouvoir suivre l'évolution dans le temps de la qualité du milieu. Bodin et al. (2004) montrent toutefois que, pour des sites échantillonnés de manière identique durant deux années successives, les IB<sup>50</sup> calculés indépendamment pour les deux années présentent des valeurs similaires. Cette observation laisse alors envisager la possibilité de comparer les IB calculés au cours d'années successives sur un même réseau de stations.

L'IB développé ici s'appuie essentiellement sur la méthode décrite par Beliaeff et Burgeot (2002). Il s'en distingue toutefois en introduisant dans le calcul des valeurs de référence, permettant ainsi la représentation des inductions et des inhibitions. Cette indice permet également de prendre en considération, pour la première fois, la réponse des deux

---

<sup>49</sup> Plusieurs exemples d'induction et d'inhibition de la GST, de la GPx et du GSH sont fournis dans les chapitres 4 et 5 de ce manuscrit.

<sup>50</sup> L'IBR est également basé sur une normalisation centrée réduite des données (Beliaeff et Burgeot, 2002).

biomarqueurs reconnus de la perturbation endocrinienne dans un outil potentiellement utilisable à des fins de gestion des milieux aquatiques. Plusieurs questions restent toutefois posées et seule l'utilisation en routine de cet IB validera désormais l'intérêt et la pertinence de celui-ci.





## Chapitre 7 : Discussion générale

### 7.1. L'ÉPINOCHÉ COMME ESPÈCE SENTINELLE POUR LA SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES

Au commencement de cette thèse, plusieurs arguments présentaient l'épinoche comme un modèle biologique potentiellement intéressant pour étudier l'impact de la contamination des milieux aquatiques en utilisant des biomarqueurs (Paragraphe 2.2 du manuscrit). Ce travail a permis de confirmer l'intérêt de l'épinoche pour plusieurs aspects.

#### 7.1.1. Un modèle pour l'étude de l'impact des perturbateurs endocriniens...

L'épinoche est décrite comme un modèle d'intérêt pour l'étude des perturbateurs endocriniens. Ce poisson possède en effet un biomarqueur d'œstrogénicité commun à toutes les espèces ovipares : la VTG, et un biomarqueur d'androgénicité spécifique des *Gasterosteidae* : la SPG. Le dosage de ces protéines, par des méthodes directes (Katsiadaki et al., 2002b; Katsiadaki et al., 2002a) ou indirectes (Pottinger et al., 2002), permet respectivement d'appréhender les effets (anti-)œstrogéniques et (anti-)androgéniques des substances chimiques aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* grâce au développement de cultures primaires d'hépatocytes (Bjorkblom et al., 2007) ou de cellules rénales (Jolly et al., 2006). Ces deux biomarqueurs, décrits comme des paramètres sensibles, ont été utilisés avec succès en laboratoire pour caractériser le potentiel perturbateur endocrinien des substances chimiques (Andersson et al., 2007; Katsiadaki et al., 2006). Peu d'études *in situ* se sont toutefois intéressées à ces paramètres pour mettre en évidence la contamination des milieux aquatiques par les perturbateurs endocriniens et ses effets (Allen et al., 2002; Assunção et al., 2007). En mettant en évidence des inductions de VTG mais également de SPG chez des épinoches échantillonnées dans différents cours d'eau (Article 6), nos résultats confirment l'intérêt de ce modèle pour la prise en compte des effets perturbateurs endocriniens *in situ*. Ils font

également apparaître l'épinoche comme une espèce sensible, capable de présenter une réponse biochimique suite à une exposition environnementale<sup>51</sup>.

### **7.1.2. ... et d'autres contaminants environnementaux**

Ce travail a également permis d'adapter chez l'épinoche un ensemble de dosages de biomarqueurs spécifiques de la métabolisation des xénobiotiques, du stress oxydant et de la neurotoxicité. Ce sont ainsi 8 marqueurs biochimiques qui peuvent être mesurés sur un même individu dont la taille est comprise entre 3,5 et 6,5 cm. Si les exemples d'approche multi-biomarqueurs sont nombreux dans la littérature scientifique, force est tout de même de constater que ces études s'intéressent essentiellement à des poissons de grande taille (*e.g.* anguille, chevaie, gardon, goujon, truite) offrant alors, comparativement à l'épinoche, une quantité de tissus importante pour la réalisation des dosages biochimiques (Aarab et al., 2004; Faller et al., 2003; Van der Oost et al., 1996). La batterie de biomarqueurs ainsi développée ne prend toutefois en compte qu'un nombre limité de processus physiologiques et pourrait être étendue en intégrant par exemple des mesures de dommages génotoxiques dans le sang (Wirzinger et al., 2007).

Exception faite de la caractérisation très complète des cholinestérases de l'épinoche (Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2000; Wogram et al., 2001) et de quelques informations relatives à l'induction de l'activité EROD par des composés organiques halogénés (Holm et al., 1994; Holm et al., 1993), aucune donnée n'était disponible quant à la réponse des différents biomarqueurs mis en place chez cette espèce. La caractérisation de la réponse des biomarqueurs en conditions contrôlées permet de positionner l'épinoche, en terme de sensibilité et d'inductibilité, par rapport aux autres espèces (Chapitre 4 du manuscrit). Il ressort de cette comparaison que les biomarqueurs mesurés chez l'épinoche présentent une sensibilité comparable à celle qui est rapportée pour d'autres espèces fréquemment utilisée pour la surveillance des milieux aquatiques continentaux ou estuariens. Ces résultats de laboratoire sont confirmés *in situ* où les réponses biochimiques mesurées permettent la discrimination des sites d'étude (Chapitre 4 du manuscrit).

---

<sup>51</sup> Les concentrations retrouvées dans l'environnement sont généralement inférieures à celles utilisées en laboratoire.

### 7.1.3. Du laboratoire au terrain, du terrain au laboratoire

Suite au développement ou à l'adaptation des méthodes de dosage, ce travail s'articule selon une démarche qui consiste, dans un premier temps à caractériser les biomarqueurs au laboratoire, en conditions contrôlées et, dans un second temps, à mettre en œuvre ces dosages sur des poissons collectés *in situ* afin de caractériser la réponse des biomarqueurs dans un contexte complexe et d'en apprécier la pertinence en tant qu'outil de surveillance de la qualité de l'environnement.

L'application des biomarqueurs sur le terrain peut alors être à l'origine de nombreux questionnements qui ne trouvent pas réponse en l'état actuel des connaissances. A titre d'exemple, suite aux observations effectuées sur la Rhonelle, une station présentant une concentration élevée en cadmium, et sur laquelle les épinoches femelles se caractérisent par une induction de SPG (Article 6), il est légitime de s'interroger sur l'implication du cadmium dans la réponse androgénique mesurée chez les poissons. Ce questionnement est d'autant plus fondé que plusieurs études mettent en avant la capacité de ce métal à interagir avec le système endocrinien (Canapa et al., 2007; Kime, 1984; Martin et al., 2002).

La petite taille de l'épinoche ainsi que sa facilité de maintien et de reproduction en laboratoire permettent alors de pouvoir répondre aux interrogations suscitées par les résultats obtenus *in situ* en mettant aisément en œuvre des expérimentations en conditions contrôlées. Dans le cadre de notre exemple, des expositions à différentes concentrations en cadmium puis à des mélanges binaires entre le cadmium et des androgènes de référence (*i.e.* 17 $\alpha$ MT et dihydrotestostérone), ont montré que le cadmium seul n'induit pas la SPG mais qu'il est capable de potentialiser les inductions générées par des androgènes de référence (données non présentées).

L'épinoche permet donc d'appréhender, au laboratoire, les aspects mécanistes qui soutendent les observations faites sur le terrain sans se heurter aux difficultés qui font suite à un changement d'espèce souvent nécessaire lorsque les poissons étudiés dans le milieu ne peuvent pas être maintenus et exposés en laboratoire du fait de leur taille ou de leurs exigences écologiques.

#### 7.1.4. Une distribution géographique favorable ?

Nos travaux sur le terrain ont montré que l'épinoche pouvait coloniser des zones fortement anthropisées comme c'est le cas pour les stations du Réveillon, de l'Escaut et de la Rhonelle mais également des zones très faiblement contaminées à l'image du site du Vallon du Vivier. A l'instar de nombreuses espèces qui ne vivent que dans des eaux de très bonne qualité (*Salmonidae*) ou inversement dans des eaux présentant des niveaux de contamination significativement élevés (*Cyprinidae*), cette large distribution confère un avantage considérable à l'épinoche puisqu'il est possible de comparer les résultats obtenus sur des sites fortement contaminés à ceux provenant de sites de très bonne qualité susceptibles de représenter les valeurs physiologiques normales de l'épinoche (Paragraphe 5.2 du manuscrit). Cette observation permet alors d'envisager une interprétation plus rigoureuse de la réponse des biomarqueurs.

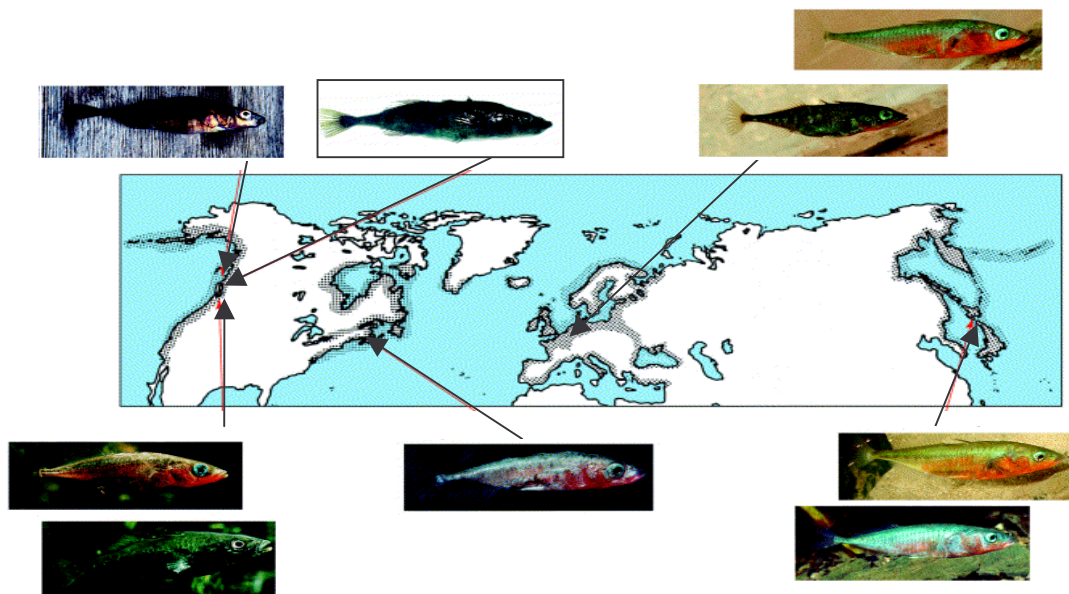


Figure 7-1 : Variation phénotypique observée chez l'épinoche à trois épines en fonction de sa localisation géographique (d'après Mc Kinnon et Rundle, 2002).

Outre cette distribution écologique étendue, l'épinoche est souvent décrite comme une espèce largement distribuée dans l'hémisphère nord que l'on retrouve dans les eaux douces et saumâtres des régions tempérées et sub-polaires (Wootton, 1976; 1984). Derrière ce même nom se cache toutefois une grande diversité aussi bien génétique que phénotypique (Figure 7-1)(Braithwaite et Odling-Smee, 1999; McKinnon et Rundle, 2002). A notre connaissance, aucune donnée relative aux variations des biomarqueurs étudiés dans le cadre de ce travail en fonction de l'origine géographique, du génotype ou du phénotype n'est disponible dans la

littérature. Schaarschmidt et Jurss (2003) ont toutefois montré des différences significatives entre les activités catalytiques de la citrate synthase, de la lactate deshydrogénase et de la malate deshydrogénase mesurées chez des épinoches collectées en eau douce et en mer. Ces résultats laissent alors envisager la possibilité de différences pour d'autres paramètres biochimiques. Aussi, notre démarche expérimentale pourrait être utilisée afin de caractériser les valeurs physiologiques et les profils de réponse des biomarqueurs pour des populations d'épinoches d'eau douce ou marines ailleurs en Europe et dans le monde.

## **7.2. QUELLE PLACE POUR UNE BATTERIE DE BIOMARQUEURS DANS LA STRATEGIE DE SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES ?**

Il est désormais admis que le recours à un ensemble de biomarqueurs complémentaires permet alors une meilleure caractérisation de la contamination et de ses effets sur les organismes (Galloway et al., 2004a). Nos résultats obtenus sur le terrain confirment l'intérêt d'une approche basée sur la mesure d'une batterie de marqueurs biochimiques pour discriminer les sites d'étude et établir un diagnostic reposant sur la réponse des organismes à la pollution (Articles 5 et 6).

### **7.2.1. Validité des conditions de référence**

L'exploitation du plein potentiel des biomarqueurs repose sur une définition claire des conditions de référence (Paragraphe 5.2 du manuscrit). C'est de ce choix que va découler la justesse dans la description des effets observés (Nixon et al., 1996). La définition des conditions de référence est d'ailleurs un point clé de la mise en œuvre de la directive Européenne cadre sur l'eau. Afin de quantifier un impact environnemental, le problème peut alors être réduit à la définition d'une référence acceptable pour laquelle les altérations anthropiques sont négligeables ou, idéalement, absentes. Dans cet objectif, plusieurs stratégies peuvent être adoptées.

- La définition d'une référence relative permet de déterminer un différentiel de réponse par rapport à un site plus ou moins proche en amont. Cette méthodologie est classiquement utilisée dans le cas d'études ponctuelles de type amont/aval (Stanic et al., 2006; Vigano et al., 1998) ou de profil de cours d'eau (Machala et al., 2000). Elle se heurte toutefois au problème de l'échantillonnage des poissons et plus précisément de la présence des espèces

d'intérêt sur l'ensemble des sites<sup>52</sup>. Pour pallier à cette contrainte, il est possible d'utiliser des poissons d'élevage placés dans des cages sur les différentes stations d'étude<sup>53</sup> (Al-Arabi et al., 2005; Fenet et al., 1996).

- La définition d'une référence temporelle pour un même site. Cette méthodologie permet de s'affranchir de l'extrapolation inter-site mais pose la question de la validité des données anciennes du fait de la possible variabilité inter-annuelle des biomarqueurs. En effet, si dans le cadre de notre travail, nous avons observé une absence de variabilité pour les biomarqueurs mesurés sur des sites faiblement anthropisés, ce phénomène ne peut pas être négligé (Webb et al., 2005).

- La définition d'une référence sur un site faiblement contaminé sans lien géographique direct avec les autres sites étudiés est une méthodologie classiquement mise en œuvre pour l'étude des effets de la contamination sur la réponse des biomarqueurs (Aarab et al., 2004; Mayon et al., 2006; Sturve et al., 2005). Elle soulève toutefois la question de la validité de cette référence, aussi bien du point de vue de la contamination que du point de vue géographique. Il est alors souhaitable que la sélection de ce site réponde à des critères stricts clairement énoncés comme le font Mayon et al. (2006) en proposant que les stations choisies répondent aux critères définissant les sites de référence de la directive européenne cadre sur l'eau<sup>54</sup> et soient situées dans une même écorégion.

Ces différentes méthodologies qui sont choisies en fonction des objectifs et des contraintes expérimentales, aboutissent à la définition d'une référence pragmatique intimement liée à une étude. Dans le cadre de ce travail, nous avons cherché à établir des valeurs physiologiques pouvant être utilisées comme référence comme cela se fait en biologie humaine (Paragraphe 5.2). En effet, à l'image des fluctuations naturelles des écosystèmes, il est aisément concevable que les valeurs de référence d'un biomarqueur ne se déduisent pas d'une valeur ponctuelle mais d'une succession d'états dans un domaine de fluctuation donné (Flammarion, 1997). Ainsi, les valeurs obtenues (Tableau 5-10) pourraient être consolidées et validées en les comparant à des valeurs obtenues dans des conditions identiques sur plusieurs années. La question de la validité géographique de nos valeurs reste posée. A l'image des travaux réalisées sur les communautés piscicoles (Wasson et al., 2002), nous avons choisi de

---

<sup>52</sup> La succession longitudinale des espèces piscicoles montre que les espèces rencontrées en amont des cours d'eau sont différentes des espèces rencontrées en aval (Huet, 1949).

<sup>53</sup> L'encagement permet aussi de s'affranchir des phénomènes d'adaptation à la pollution que peuvent présenter les espèces autochtones.

<sup>54</sup> 5 critères sont retenus incluant le régime hydrologique, la densité du réseau hydrographique, les conditions morphologiques, l'acidification et l'apport de nutriments organiques.

limiter l'emprise géographique de notre étude à une seule hydro-écorégion. Ce choix contient toutefois une part d'arbitraire et devrait être validé par la mesure de valeurs de biomarqueurs sur des sites aux caractéristiques similaires au sein de l'hydro-écorégion considérée mais également dans d'autres zones géographiques. Une telle démarche contribuerait alors à définir l'emprise géographique de nos résultats.

### **7.2.2. Vers quelle utilisation d'une batterie de biomarqueurs**

#### *7.2.2.1. Sonde chimique...*

Certains auteurs ont proposé l'utilisation de biomarqueurs spécifiques<sup>55</sup> en lieu et place des analyses chimiques (Peakall, 1994). On peut toutefois douter de l'intérêt des biomarqueurs en tant que simple indicateur chimique par rapport aux dosages chimiques et immuno-enzymatiques qui présentent une sensibilité et une spécificité importante (Rodolico et al., 1997). Ils présentent toutefois un avantage indéniable en prenant en considération la biodisponibilité des polluants pour les organismes étudiés.

Les résultats que nous avons obtenus en conditions contrôlées (Chapitre 4 du manuscrit) mettent en avant le manque de spécificité de biomarqueurs tels que les enzymes de biotransformation et les paramètres du stress oxydant. La réponse de ces marqueurs peut en effet être influencée par des polluants très variés. Il paraît donc illusoire de chercher à la relier à la présence d'une seule molécule ou famille de molécules. Il s'agit là d'une conclusion qui va dans le sens de nombreuses observations rapportées dans la littérature montrant que des biomarqueurs reconnus pendant longtemps pour leur spécificité peuvent répondre à des contaminants variés. C'est par exemple le cas de l'AChE qui a été historiquement décrite comme une enzyme inhibée par les organophosphorés et les carbamates mais qui peut également être affectée par les métaux lourds (Kreimer et al., 1994) et de nombreuses molécules à usage phytosanitaire (Davies et al., 1994; Ghosh, 1990; Reddy et Philip, 1994; Szabo et al., 1992).

Nous avons également montré qu'en fonction des polluants utilisés, les biomarqueurs peuvent présenter des effets contradictoires<sup>56</sup>. Conceptuellement, ce phénomène constitue un frein à l'utilisation des biomarqueurs comme sonde chimique. De récents travaux ont mis en évidence, chez des flets exposés à un mélange entre inducteur et inhibiteur de l'activité

---

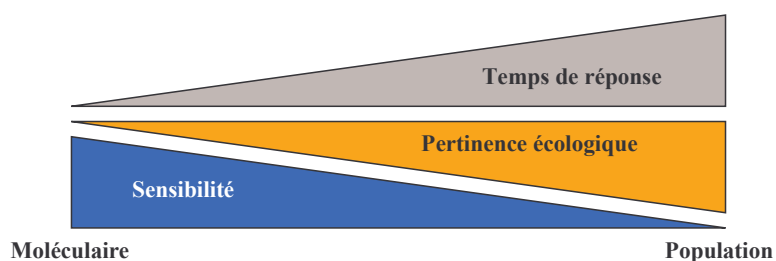
<sup>55</sup> On peut citer l'AChE parmi ces biomarqueurs.



EROD, les implications que pouvaient avoir ces interactions sur la réponse des biomarqueurs et son interprétation (Kirby et al., 2007). Comparativement à ce qui pourrait être fait en ne mesurant qu'un seul et unique marqueur biochimique, le recours à un ensemble cohérent de biomarqueurs permet une interprétation plus fine des résultats susceptible d'aboutir à l'identification de grandes familles de polluants présentes dans le milieu. Les interactions entre les contaminants peuvent toutefois complexifier l'interprétation des résultats. Il semble donc important de prendre en considération cette problématique qui évoluera au fur et à mesure de l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques.

#### 7.2.2.2. *Ou signal prédictif ?*

La récente analyse critique sur l'utilisation des biomarqueurs menée par Forbes et al. (2006) concluait sur le fait que ces paramètres ne pouvaient pas fournir d'information pertinente quant aux effets écologiques susceptibles de survenir suite à une exposition ayant entraînée leur réponse, limitant alors largement leur utilité en tant qu'outil de prospective et de diagnostic. Il est par nature difficile de relier des paramètres aussi éloignés que l'induction d'une protéine hépatique et le nombre de poissons dans un cours d'eau (Figure 7-2)(Schlenk et al., 1996). Il est toutefois possible d'établir, aussi bien au laboratoire que sur le terrain, des corrélations entre des paramètres représentant des niveaux d'organisation différentes comme par exemple l'induction du cytochrome P450 et l'indice de santé des poissons (Schlenk et al., 1996) ou l'inhibition de la VTG et la fécondité (Miller et al., 2007).

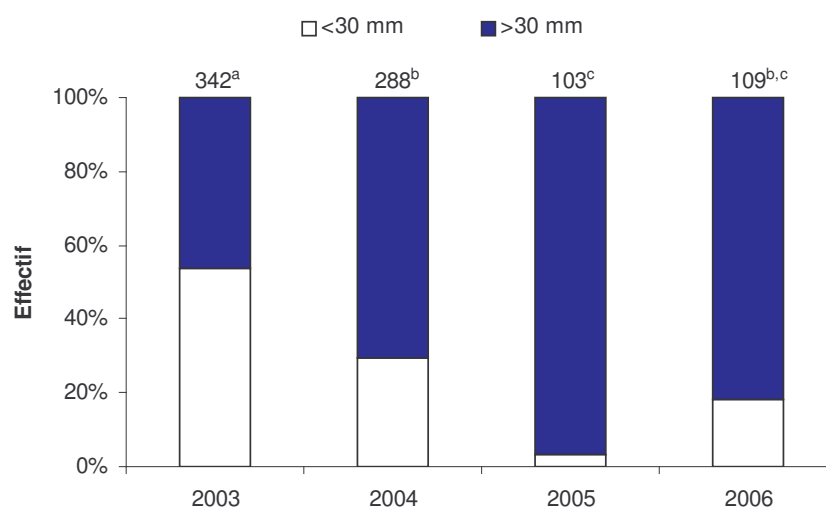


**Figure 7-2 : Relation entre le temps de réponse, la sensibilité et la pertinence écologique (d'après Schlenk et al. (1996).**

<sup>56</sup> L'activité EROD peut être induite par la  $\beta$ NF et le prochloraz mais inhibée par le cuivre et l'E2.



Les résultats obtenues sur le site de la Rhonelle illustrent bien la difficulté à relier les effets individuels aux paramètres populationnels (Article 6 et paragraphe 5.3 du manuscrit). Les épinoches collectées sur cette station qui subit une pression urbaine dense, se caractérisent par des inductions significatives de la VTG et de la SPG en plus d'une inhibition marquée de l'ACHé et d'un stress oxydant inducteur de lipoperoxydation. Parallèlement, l'analyse des données populationnelles montre une diminution de l'effectif global des épinoches accompagnée d'une réduction de la proportion des épinoches de petite taille (Figure 7-3) et le peuplement piscicole s'avère modérément perturbé (*i.e.* IPR = 20,07). On peut alors penser à un lien causal entre la réponse biochimique des poissons et les perturbations populationnelles. Toutefois, *in situ*, de nombreux facteurs peuvent avoir un impact négatif sur la structure du peuplement piscicole (Attrill et Depledge, 1997). Ainsi, seule la réalisation de mesures complémentaires à des niveaux d'organisation intermédiaires incluant la recherche d'altérations histologiques dans le tissu gonadique, de déséquilibre du sex-ratio ou encore d'une diminution de la fertilité, pourrait étayer l'hypothèse d'un lien entre ces différentes observations à l'image des travaux réalisés par Faller et al. (2003) chez des goujons prélevés dans des cours d'eau impactés par des rejets de stations d'épuration.



**Figure 7-3 : Distribution des épinoches de moins de 1 an (<30mm) et de plus de 1 an (>30mm) sur le site de la Rhonelle entre 2003 et 2006. L'effectif estimé est indiqué au-dessus des histogrammes. Les données sont présentées en fréquence relative. Les années annotées avec des lettres différentes présentent une différence significative (test de Chi-2,  $p < 0.05$ ).**

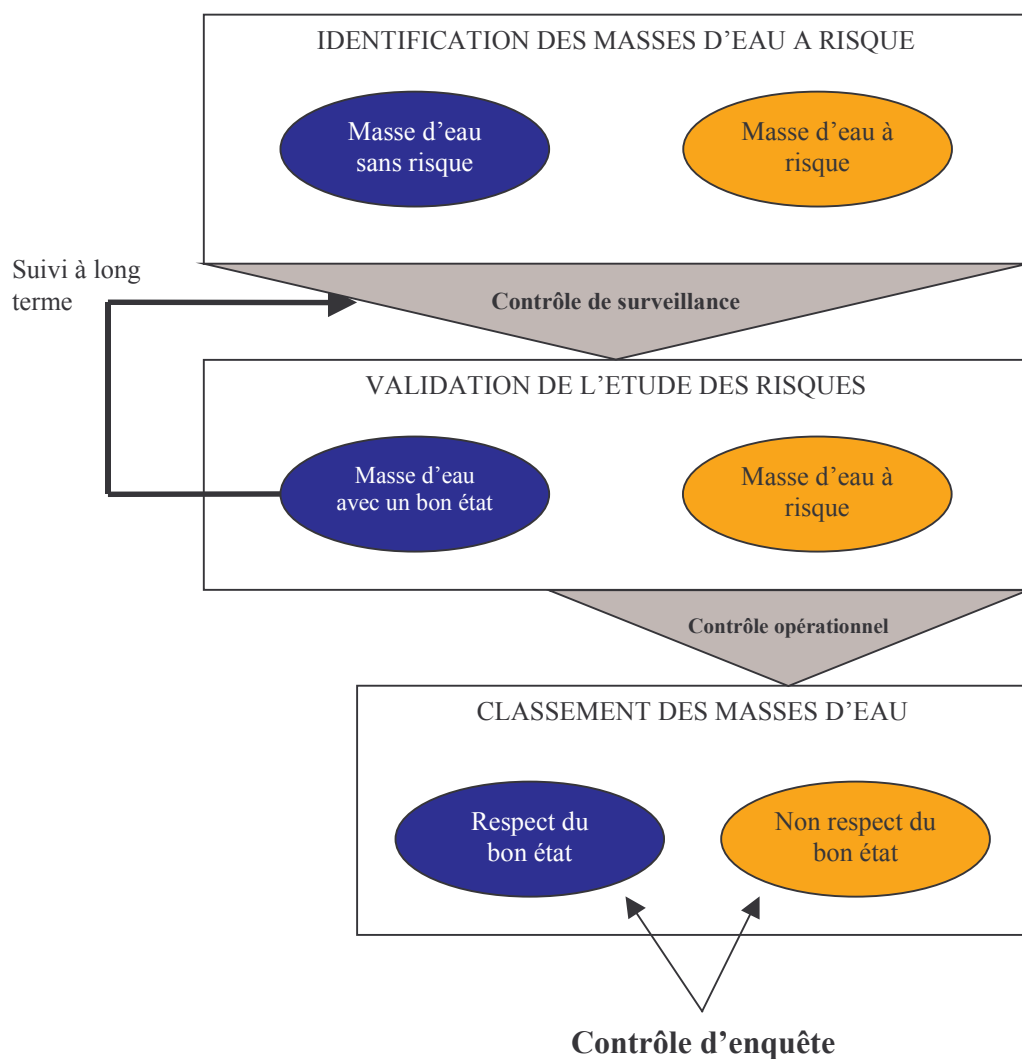


Figure 7-4 : Description séquentielle des programmes de surveillance de la qualité des masses d'eau préconisés par la directive européenne cadre sur l'eau (d'après Hagger et al. (2006)).

### 7.2.3. Un outil complémentaire

L'annexe 5 de la directive européenne cadre sur l'eau recommande la mise en œuvre de trois catégories de programmes de surveillance des masses d'eau (Figure 7-4) avec des contrôles de surveillance pour assurer le suivi à long terme des changements de la qualité de l'eau, des contrôles opérationnels qui permettent le recueil des données pour des masses d'eau dites à risques et des contrôles d'enquête permettant la recherche des causes de dégradation de la qualité du milieu. Ces différents programmes de suivi de la qualité de l'eau sont basés sur la mesure de paramètres chimiques et écologiques. Toutefois, comme nous l'avons discuté ci-dessus, les biomarqueurs ne peuvent pas se substituer à ces différentes analyses. Ils doivent donc être considérés comme des outils complémentaires qui apportent une information relative à l'état de santé des poissons, qui intègre la biodisponibilité des polluants et qui est susceptible de renseigner sur la cause éventuelle d'effets observés à des niveaux supérieurs d'organisation (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

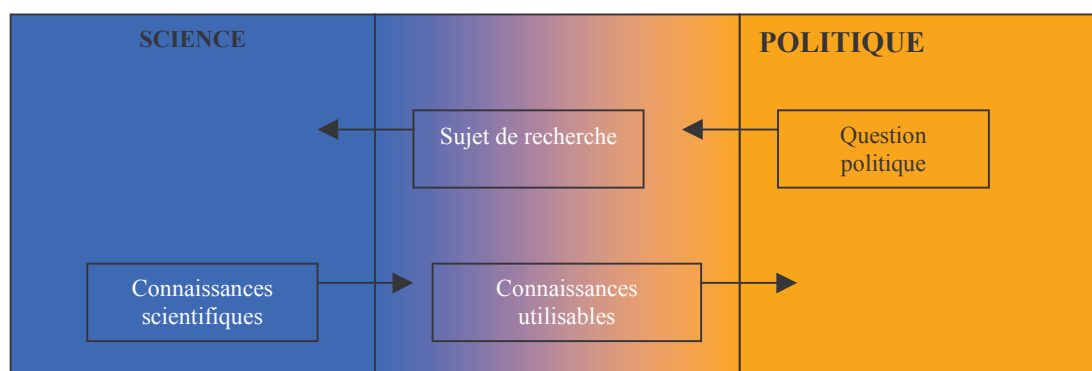
Du fait de cette complémentarité, les biomarqueurs peuvent trouver une place légitime dans les différents types de programmes de contrôle de la qualité de l'eau en permettant l'identification d'effets biologiques précoces (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003) ou de sources de contamination (Galloway et al., 2004a), en précisant le lien mécaniste entre exposition des organismes et effets sur les organismes (Galloway et al., 2004b), en participant à la compréhension de liens éventuels entre la contamination chimique et les effets écologiques (Au, 2004; Van der Oost et al., 2003). Une application aussi exhaustive des biomarqueurs aurait alors des implications économiques fortes en augmentant considérablement le coût des programmes de surveillance. Une application raisonnée des biomarqueurs pourrait être envisagée selon deux axes :

- Dans le cadre du contrôle d'enquête afin de prendre en considération les effets éventuels de la contamination sur les organismes, d'orienter des analyses chimiques complémentaires et donc de permettre une meilleure caractérisation du risque lié à la zone considérée.
- Lorsque les analyses chimiques ne mettent pas en évidence de dégradation de la qualité chimique du milieu, qu'il y ait ou non une dégradation de la qualité écologique des cours d'eau. Une telle approche pourrait alors permettre d'orienter d'éventuelles analyses chimiques complémentaires afin d'identifier une contamination potentielle par des polluants non recherchés en première intention. Elle serait particulièrement féconde en utilisant des

biomarqueurs spécifiques comme c'est le cas pour les perturbateurs endocriniens où la recherche de composés spécifiques pourrait être entreprise suite à la détection d'induction de VTG et/ou de SPG chez les poissons.

#### 7.2.4. Vers le développement d'un indicateur environnemental spécifique

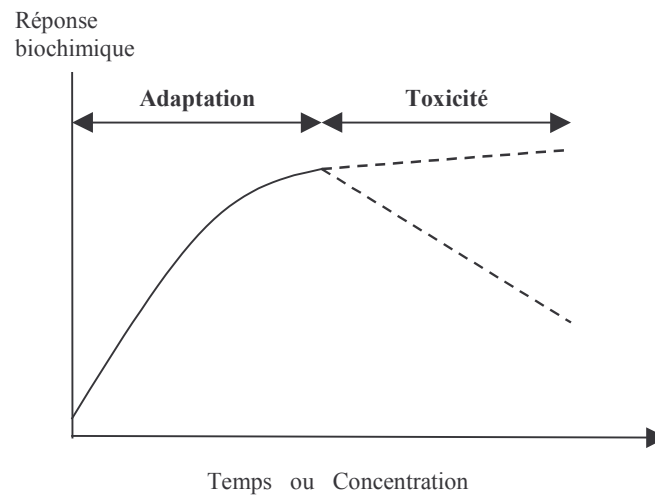
Afin que les résultats fournis par les biomarqueurs ne restent pas des données exploitées et exploitables par les seuls scientifiques qui utilisent ces outils, le recours à des indicateurs environnementaux s'avère nécessaire. Ces derniers sont définis comme un ensemble de paramètres qui peut être qualitatif ou quantitatif, intégrateur ou pas, et qui indique l'état actuel et/ou attendu d'une zone géographique donnée à un niveau d'organisation donné (Turnhout et al., 2007). En fournissant une réponse basée sur des connaissances et des données scientifiques à une question relative à la gestion de l'environnement, ces indicateurs environnementaux se placent donc à la frontière entre science et politique (Figure 7-5).



**Figure 7-5 : Conceptualisation de l'interface entre science et politique. A cette interface, les connaissances scientifiques deviennent des connaissances utilisables et les questions politiques deviennent des sujets de recherche (Turnhout et al., 2007).**

Dans le domaine des biomarqueurs et de leur utilisation *in situ*, plusieurs auteurs ont développé des méthodes regroupées sous le terme d'indice "biomarqueurs" (IB) qui permettent de synthétiser en une valeur et/ou une figure, la réponse d'un ensemble de biomarqueurs. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons nous aussi développé un IB prenant en considération des contraintes expérimentales telles que la possibilité d'induction et d'inhibition pour un même paramètre ou la prépondérance des marqueurs du stress oxydant. A l'image des biomarqueurs, cet indice apporte une information complémentaire à celle d'autres indices classiquement utilisés pour le gestion des milieux aquatiques et qui sont basés sur la contamination chimique des milieux ou sur la perturbation des communautés.

Toutefois, contrairement à ces derniers, il ne doit pas être considéré comme un outil de gestion mais comme un simple moyen de synthèse des données.



**Figure 7-6 : Difficulté pour distinguer toxicité et réponse adaptative (d'après Mayer et al. (1992)).**

Seule l'association entre l'IB (*i.e.* sa valeur et sa représentation graphique) et une description claire du niveau d'impact et de ses implications permettrait de considérer l'IB comme un outil susceptible d'appuyer des décisions relatives à la gestion des milieux (Chapman, 1991). Cette voie de développement est intimement liée à la définition de classe d'IB comme cela a déjà été initié pour d'autres indices basés sur la réponse des biomarqueurs (Aarab et al., 2004; Bocquene et al., 2004). Ce travail se heurte toutefois à la non linéarité de la réponse des biomarqueurs liée à la réversibilité de certains paramètres (Chapitre 4 du manuscrit) et à des phénomènes de toxicité (Figure 7-6). Conceptuellement, l'IB mesuré sur un site fortement impacté pourrait être plus faible que celui calculé sur un site modérément impacté. Aussi, seule une accumulation de données acquises sur un grand nombre de sites durant plusieurs années pourrait permettre une avancée significative dans le développement et la validation de l'IB.



## Chapitre 8 : Conclusion générale

Face à la nécessité de surveiller la qualité des milieux aquatiques, les biomarqueurs offrent la possibilité d'intégrer les effets précoces de la contamination sur les organismes. En raison de la diversité des polluants et de la multiplicité de leurs effets, seule l'utilisation d'un ensemble cohérent de biomarqueurs semble pouvoir rendre compte de cette complexité. Dans ce contexte, les biomarqueurs se présentent comme des outils susceptibles d'apporter des informations complémentaires à celles fournies par les analyses chimiques et les études populationnelles.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes attaché à l'évaluation du potentiel de l'épinoche à trois épines en tant qu'espèce sentinelle utilisable pour l'évaluation de la qualité des cours d'eau à l'aide d'une batterie de biomarqueurs. Ce travail a été utile sous différents aspects et a permis :

- L'adaptation, chez l'épinoche, de méthodes classiquement mises en œuvre en toxicologie de l'environnement, permettant l'étude des biomarqueurs de la métabolisation des xénobiotiques (EROD et GST) et du stress oxydant et de ses effets (SOD, CAT, GPx, GSH et TBARS).
- Le développement et la validation de méthodes immuno-enzymatiques robustes et sensibles pour le dosage de la VTG et de la SPG qui permettent d'exploiter le plein potentiel de l'épinoche en appréhendant les effets des perturbateurs endocriniens œstrogéno- et androgéno-mimétiques.
- La caractérisation de la spécificité, la sensibilité, l'inductibilité et la réversibilité des biomarqueurs contribuant ainsi à une meilleure définition des avantages et des limites d'utilisation de ces outils. Les données obtenues ont été comparées à celles disponibles chez d'autres espèces de poisson et ont mis en évidence la bonne sensibilité de l'épinoche.
- La caractérisation de la variabilité des biomarqueurs. Il a débouché sur la détermination de valeurs de référence qui prennent en considération le sexe des individus et de la période d'échantillonnage. Ces valeurs basales, dont la validité géographique reste à valider, permettent d'envisager une utilisation des biomarqueurs au sein d'un réseau.
- La mise en évidence de l'intérêt de la mesure des biomarqueurs chez l'épinoche pour évaluer les effets de la contamination sur la réponse biochimique des individus et pour

discriminer les sites d'étude. Ces résultats sont les premiers à confirmer, chez cette espèce, l'intérêt de la mesure d'une batterie de biomarqueurs positionnant alors l'épinoche comme un poisson d'intérêt pour les études de surveillance de la qualité de l'environnement.

- La démonstration de l'intérêt d'une approche multi-paramétrique combinant la mesure des biomarqueurs chez l'épinoche à des analyses chimiques et à des études populationnelles dans le milieu. Les données complémentaires recueillies concourent à une meilleure caractérisation de la contamination des sites et des effets.

- L'initiation d'un travail autour de la synthèse des données issues des études multi-biomarqueurs. Ce dernier a conduit au développement d'un indice "biomarqueur" (IB) qui associe une représentation graphique des effets et une valeur numérique qui en reflète l'intensité.

Ce travail débouche sur la validation d'une batterie de biomarqueurs chez l'épinoche et montre l'intérêt de cet outil dans le cadre d'approches multi-paramétriques permettant la surveillance des cours d'eau. Les résultats de cette thèse offrent alors de nombreuses perspectives pratiques, méthodologiques et mécanistes.

D'un point de vue pratique, ce travail laisse envisager la possibilité d'une utilisation, des outils développés, à plus grande échelle. Cette extension nécessite alors l'étude de la réponse des biomarqueurs sur plusieurs sites de référence afin de prendre en compte une éventuelle variabilité géographique de leurs valeurs basales. Ainsi, outre le fait qu'un tel travail fournisse des données susceptibles de renseigner sur la contamination du milieu, il contribuerait également à une meilleure caractérisation de la variabilité des biomarqueurs et à la validation de l'IB comme outil de gestion des milieux aquatiques.

D'un point de vue méthodologique, cette thèse a permis des avancées significatives quant au développement des biomarqueurs chez l'épinoche. Cette étude ne prend en considération qu'un nombre limité d'effets (*i.e.* métabolisation des xénobiotiques, stress oxydant, neurotoxicité, perturbation endocrinienne œstrogéno et androgéno-mimétique). Il pourrait être envisagé d'accroître le nombre de biomarqueurs dans la batterie afin d'en augmenter l'exhaustivité. Deux axes de développement peuvent être envisagés :

- En permettant d'appréhender la contamination œstrogénique et androgénique, l'épinoche apparaît comme un modèle d'intérêt pour l'étude des perturbateurs endocriniens. D'autres marqueurs spécifiques de cette fonction pourraient alors être développés chez cette espèce. On peut citer, par exemple, l'activité du cytochrome P450 aromatase qui est impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogènes et dont l'intérêt en tant que



biomarqueur utilisable *in situ* chez le poisson a été récemment mis en évidence (Hecker et al., 2007; Noaksson et al., 2003; Noaksson et al., 2001).

- D'autres molécules sont également impliquées dans la contamination des écosystèmes aquatiques. Aussi, afin de prendre en considération la diversité des contaminants et la multiplicité de leurs effets, des marqueurs spécifiques d'autres effets biologiques pourraient être envisagés chez l'épinoche. A titre d'exemple, on peut indiquer les biomarqueurs de génotoxicité (*e.g.* test des comètes, test des micronoyaux) dont l'intérêt chez l'épinoche a récemment été démontré (Wirzinger et al., 2007).

Enfin, un dernier axe de développement de notre travail pourrait permettre une meilleure interprétation des résultats obtenus *in situ*. Dans cette perspective, deux voies de recherche distinctes peuvent être considérées.

- Nous avons montré à plusieurs reprises la nécessité d'étudier les interactions entre les contaminants et leurs effets sur la réponse des biomarqueurs. Le passage par des études en conditions contrôlées pourraient permettre une meilleure compréhension de ces interactions ainsi que leur prise en compte dans l'interprétation des résultats obtenus *in situ*.

- L'établissement d'un lien entre des perturbations de la réponse des biomarqueurs et des effets à des niveaux d'organisation supérieurs est souvent difficile à démontrer. Cette carence limite l'utilisation des biomarqueurs. La mesure, aussi bien en laboratoire que sur le terrain, de nombreuses variables biologiques caractéristiques de différents niveaux d'organisation incluant les paramètres biochimiques d'intérêt mais également des altérations histologiques et morphologiques ainsi que des perturbations du comportement, de la fertilité ou de la fécondité pourrait déboucher sur une meilleure compréhension des relations entre ces différents niveaux.

La mise en œuvre de ces perspectives conduirait à une caractérisation plus fine de l'exposition des organismes à la contamination des milieux aquatiques et à une meilleure connaissance des implications physiologiques de cette exposition.



## Références bibliographiques

- Aarab, N., Champeau, O., Mora, P., Daubeze, M., Garrigues, P., Narbonne, J.F. 2004. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers* **9**: 258-270.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Ryon, M.G., Jimenez, B.D., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Hinton, D.E. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress in fish. *Marine Environmental Research* **28**: 459-464.
- Aït-Aïssa, S., Ausseil, O., Palluel, O., Vindimian, E., Garnier-Laplace, J., Porcher, J.M. 2003. Biomarker responses in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after single and combined exposure to low doses of cadmium, zinc, PCB 77 and 17 $\beta$ -estradiol. *Biomarkers* **8**: 491-508.
- Al-Arabi, S.A.M., Adolfsson-Erici, M., Waagbø, R., Ali, M.S., Goksøyr, A. 2005. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged fish exposed to effluents from anthropogenic sources in the Karnaphuly river, Bangladesh. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 1968-1978.
- Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., Gonzalez, C. 2006. A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* **69**: 302-322.
- Allen, J.I., Moore, M.N. 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* **58**: 227-232.
- Allen, Y., Balaam, J., Bamber, S., Bates, H., Best, G., Begnell, J., Brown, E., Craft, J., Davies, J.M., Depledge, M.H., Dyer, R.A., Feist, S., Hurst, M.R., Hutchinson, T.H., Jones, G., Jones, M.B., Katsiadaki, I., Kirby, M.F., Leah, R., Matthiessen, P., Megginson, C., Moffat, C.F., Moore, A., Pirie, D., Robertson, F., Robinson, C.D., Scott, A.P., Simpson, M.G., Smith, A., Stagg, R.M., Struthers, S., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L., Waldock, M.J., Walker, P. 2002. Final report : Endocrine Disruption in the Marine Environment (EDMAR), pp. 67.
- Amiard, J.C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Londres, Paris, New York, pp. XXI-XXXI.
- Anderson, M.J., Miller, M.R., Hinton, D.E. 1996. In vitro modulation of 17- $\beta$ -estradiol-induced vitellogenin synthesis: effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology* **34**: 327-350.
- Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., Orberg, J. 2007. Effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* **83**: 33-42.
- Andreassen, T.K., Skjoedt, K., Korsgaard, B. 2005. Upregulation of estrogen receptor  $\alpha$  and vitellogenin in eelpout (*Zoarces viviparus*) by waterborne exposure to 4-tert-octylphenol and 17 $\beta$ -estradiol. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology &*

*Pharmacology* **140**: 340-346.

Aniya, Y., Anders, M. 1989. Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 1998-2002.

Arukwe, A., Goksøyr, A. 1997. Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *The Journal of Experimental Zoology* **277**: 313-325.

Arukwe, A., Forlin, L., Goksøyr, A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 2576-2583.

Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøyr, A. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* **49**: 159-170.

Assunção, M., Gage, M., Reynolds, J., Katsiadaki, I., Grant, A. 2007. Endocrine disrupters in UK rivers : no evidence of effects on field populations of threespined stickleback, 17th annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Porto, Portugal.

Astley, K.N., Meigh, H.C., Glegg, G.A., Braven, J., Depledge, M.H. 1999. Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin* **39**: 145-154.

Attrill, M.J., Depledge, M.H. 1997. Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organisation. *Aquatic Toxicology* **38**: 183-197.

Au, D.W.T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 817-834.

Axelsson, B., Norrgren, L. 1991. Parasite frequency and liver anomalies in three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.), after long term exposure to pulp mill effluents in marine mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **21**: 505-513.

Babin, M., Casado, S., Chana, A., Herradon, B., Segner, H., Tarazona, J.V., Navas, J.M. 2005. Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicology in Vitro* **19**: 899-902.

Babo, S., Vasseur, P. 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **22**: 61-68.

Bach, J., Snegaroff, J. 1989. Effects of the fungicide prochloraz on xenobiotic metabolism in rainbow trout : *in vivo* induction. *Xenobiotica* **19**: 1-9.

Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J., Snook, J.C. 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the Grey Mullet, *Chelon labrosus*. *Marine Environmental Research* **45**: 357-365.

Balon, E.K. 1975. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. *Journal of Fish Research Board Canada* **32**: 821-864.

Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A. 2007. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 497-505.

Beliaeff, B., Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**: 1316-1322.

- Bell, A.M. 2001. Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour* **62**: 775-780.
- Bell, M.A., Foster, S.A. 1994. The evolutionary biology of the threespine stickleback. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 571 pp.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J., Mannervik, B. 1994. Detoxication of base propenals and other  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by Human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 1480-1484.
- Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.K., Hamre, K. 2000. Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed high levels of dietary copper and cadmium. *Fish Physiology and Biochemistry* **23**: 35-48.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R. 2001. Accumulation of metals in the tissues of three spined stickelback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **48**: 117-127.
- Bessho, H., Iwakami, S., Hiramatsu, N., Hara, A., Hashimoto, S. 2000. Development of a sensitive luminometric immunoassay for determining baseline seasonal changes in serum vitellogenin levels in male flounder (*Pleuronectes yokohamae*). *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* **76**: 155-166.
- Bjorkblom, C., Olsson, P.-E., Katsiadaki, I., Wiklund, T. 2007. Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* doi: **10.1016/j.cbpc.2007.05.004**.
- Blaise, C., Gagne, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., Trottier, S. 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay fjord with the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Environmental Toxicology* **17**: 170-186.
- Blankvoort, B.M.G., Rodenburg, R.J.T., Murk, A.J., Koeman, J.H., Schilt, R., Aarts, J.M.M.J.G. 2005. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: Indications for mixture effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**: 263-272.
- Blazquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Donaldson, E.M. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary  $17\alpha$ -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* **135**: 329-342.
- Bocquene, G., Chantereau, S., Beausir, E., Raffin, B., Minier, C., Cachot, J., Clérandeau, C., Leskovicz, A.P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Ménard, D. 2004. Programme de suivi des conséquences écologiques et écotoxicologiques de la marée noire de l'Erika. Projet n°7 : MONERIKA - suivi des effets biologiques du pétrole de l'Erika sur la moule (*Mytilus edulis*) des zones contaminées. Rapport de contrat IFREMER-MEDD-INERIS, pp. 28.
- Bocquéné, G., Galgani, F. 1998. Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds. *Techniques in Marine Environmental Science* **22**: 1-12.
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J.Y., Bocquene, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y., Budzinski, H. 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **138**: 411-427.

- Borg, B., Antonopoulou, E., Andersson, E., Carlberg, T., Mayer, I. 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Canadian Journal of Zoology* **71**: 2327-2329.
- Brack, W., Klamer, H.J.C., López de Alda, M., Barceló, D. 2007. Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins : a review. *Environmental Science and Pollution Research* **14**: 30-38.
- Braithwaite, V.A., Odling-Smee, L. 1999. The paradox of the stickleback: different yet the same. *Trends of Ecology and Evolution* **14**: 460-461.
- Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L., Hansen, P.D. 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea. *Helgol Marine Research* **53**: 219-243.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksøyr, A., Porcher, J.M. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**: 1699-1708.
- Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E., Porcher, J.M. 2000. Two step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mychiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B* **737**: 3-12.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P. 2004. Impacts of 17 $\beta$ -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **68**: 193-217.
- Broeg, K., Westernhagen, H.v., Zander, S., Korting, W., Koehler, A. 2005. The "bioeffect assessment index" (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 495-503.
- Brousseau, P., Dunier, M., Deschaux, P., De Guise, S., Krzystyniak, K., Fournier, M., 1997. Marqueurs immunologiques. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 1-9.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.L. 1997. Oxidative damage to DNA : formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **131**: 1-87.
- Camus, L., Jones, M.B., Borseth, J.F., Grosvik, B.E., Regoli, F., Depledge, M.H. 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Marine Environmental Research* **54**: 425-430.
- Canapa, A., Barucca, M., Gorbi, S., Benedetti, M., Zucchi, S., Biscotti, M.A., Olmo, E., Nigro, M., Regoli, F. 2007. Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): A role for environmental cadmium? *Chemosphere* **66**: 1270-1277.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R. 1992a. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. I. Méthodologie. *S.T.P. Pharma Pratiques* **2** **4**: 205-226.



- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R. 1992b. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. II. Exemples d'application. *S.T.P. Pharma Pratiques* **2** 4: 227-239.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Levi, Y. 2007. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using *in vivo* and *in vitro* assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 149-156.
- Celander, M., Leaver, M.J., George, S.G., Forlin, L. 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) liver : a time course study. *Comparative Biochemistry and Physiology* **106C**: 343-349.
- Chan, P.C., Peller, O.G., Kesner, L. 1982. Copper (II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids* **17**: 331-337.
- Chandrasekara, L.W.H.U., Pathiratne, A. 2007. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 109-119.
- Chapman, P.M. 1991. Environmental quality criteria : what type should we be developing ? *Environmental Science and Technology* **25**: 1353-1359.
- Charissou, A.M., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P. 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of The Total Environment* **322**: 109-122.
- Chèvre, N., Gagné, F., Blaise, C. 2003a. Development of a biomarker-based index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites. *Biomarkers* **8**: 287-298.
- Chèvre, N., Gagné, F., Gagnon, P., Blaise, C. 2003b. Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* **51**: 13-23.
- Cionna, C., Maradonna, F., Olivotto, I., Pizzonia, G., Carnevali, O. 2006. Effects of nonylphenol on juveniles and adults in the grey mullet, *Liza aurata*. *Reproductive Toxicology* **22**: 449-454.
- Conseil de la Communauté Européenne 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. The European Parliament and Council, L327/1, 2000, pp. 72.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R. 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquatic Toxicology* **76**: 258-267.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **279**: 1-20.
- Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., Focardi, S. 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Marine Pollution Bulletin* **46**: 203-212.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997. Mécanismes de formation and effets des espèces réactives de l'oxygène. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Londres, Paris,

New York, pp. 1-9.

Covens, M., Covens, F., Ollevier, F., De Loof, A. 1987. A comparative study of some properties of vitellogenin (Vg) and yolk proteins in a number of freshwater and marine teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **88**: 75-80.

Cravedi, J.P., Boudry, G., Baradat, M., Rao, D., Debrauwer, L. 2001. Metabolic fate of 2,4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative *in vivo/in vitro* approach. *Aquatic Toxicology* **53**: 159-172.

Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G. 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1573**: 4-8.

Davies, P.E., Cook, L.S.J., Goenarso, D. 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 1341-1354.

De Ruiter, A.J.H., Mein, C.G. 1982. Testosterone-dependent transformation of nephronic tubule cells into serous and mucous gland cells in stickleback kidneys *in vivo* and *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology* **47**: 70-83.

de Wit, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* **46**: 583-624.

DEFRA 2002. The Government's Strategic Review of diffuse water pollution from agriculture in England - Paper 1: Agriculture and water: a diffuse pollution review, pp. 115.

Devaux, A., Flammarion, P., Bernardon, V., Garric, J., Monod, G. 1998. Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* **46**: 257-262.

Deviller, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco Nava, M.A., Blancheton, J.-P., Casellas, C. 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**: 89-97.

Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P. 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology* **26**: 1-22.

DIREN Ile de France 2005. Info Phytos n°4, pp. 20.

Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* **43**: 200-227.

Eastwood, S., Couture, P. 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic Toxicology* **58**: 43-56.

EEA 2001. Reporting river quality using the Water Quality Accounts methodology. Application within the Eurowaternet process, Copenhagen, pp. 24.

Eggens, M., Bergman, A., Vethaak, D. 1995. Seasonal variation of hepatic EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) in the Dutch Wadden Sea. *Marine Environmental Research* **39**: 231-234.



- Eidem, J.K., Kleivdal, H., Kroll, K., Denslow, N., van Aerle, R., Tyler, C., Panter, G., Hutchinson, T., Goksøyr, A. 2006. Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology* **78**: 202-206.
- Elbekai, R.H., El-Kadi, A.O.S. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by  $As^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ , and  $Cr^{6+}$ . *Free Radical Biology and Medicine* **39**: 1499-1511.
- Ernst, W.R., Doe, K.G. 1989. A comparison of the aquatic toxicity of fenitrothion flowable and fenitrothion liquid technical formulations. *Water Pollution Research Journal of Canada*. **24**: 553-568.
- Ernst, W.R., Jonah, P., Doe, K., Julien, G., Hennigar, P. 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**: 103-114.
- Escartin, E., Porte, C. 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **34**: 160-164.
- Faller, P., Kobler, B., Peter, A., Sumpter, J.P., Burkhardt-Holm, P. 2003. Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 2063-2072.
- Fenet, H., Casellas, C., Bontoux, J. 1996. Hepatic enzymatic activities of the european eel *Anguilla anguilla* as a tool for biomonitoring freshwater streams: laboratory and field caging studies. *Water Science and Technology* **33**: 321-329.
- Flammarion, P. 1997. Mesure *in situ* de l'induction du cytochrome P450 1A chez des cyprinidés d'eau douce. Optimisation de l'interprétation. Université de Metz, pp. 107 + annexes.
- Flammarion, P., Garric, J. 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere* **35**: 2375-2388.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J. 1996. Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **56**: 440-445.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J. 1998a. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large french watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40**: 144-153.
- Flammarion, P., Noury, P., Garric, J. 2002a. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leucinus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* **120**: 325-330.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P., Garric, J. 1998b. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquatic Toxicology* **42**: 93-102.
- Flammarion, P., Fortier, V., Migeon, B., Morfin, P., Garric, J. 1999. Cytochrome P450 1A induction in gudgeon (*Gobio gobio*): Laboratory and field studies. *Biomarkers* **4**: 59-71.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J. 2002b. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**: 145-153.

- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E. 2000. Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure : preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leucinus cephalus*). *Ecotoxicology* **9**: 127-135.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y., Valotaire, Y. 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Molecular Reproduction and Development* **48**: 317-323.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 272-280.
- Forlin, L., Blom, S., Celander, M., Sturve, J. 1996. Effects on UDP glucuronosyl transferase, glutathione transferase, DT-diaphorase and glutathione reductase activities in rainbow trout liver after long-term exposure to PCB. *Marine Environmental Research* **42**: 213-216.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J. 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 5598-5605.
- Fukada, H., Haga, A., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A. 2001. Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **130**: 163-170.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H. 2004a. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology* **38**: 1723-1731.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H. 2004b. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project - a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* **58**: 233-237.
- Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G. 2002. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **72**: 178-185.
- Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M.J. 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology* **12**: 417-426.
- Ghosh, M.C., Ghosh, R., Ray, A.K. 2001. Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-O-deethylase in cultured catfish hepatocytes. *Environmental Research* **86**: 167-173.
- Ghosh, T.K. 1990. Synthetic pyrethroid intoxication on tissue acetylcholine and acetylcholinesterase in the fish *Tilapia mossambica*. *Environmental Ecology* **8**: 950-954.
- Goksøyr, A., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Nilsen, B.M. 2003. On the need for a standardized set-up for validation studies of fish vitellogenin assays as an endpoint in endocrine disruptor testing and screening – a proposal. <http://www.biosense.com/Docs/GoksøyrEtal2003.pdf>.
- Gorbi, S., Regoli, F. 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Marine Environmental Research* **58**: 511-515.
- Gravato, C., Santos, M.A. 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**: 115-127.
- Gray, E.S., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. 1991. Sex differences in hepatic monooxygenases in

winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P450 forms by estradiol. *Journal of Experimental Zoology* **259**: 330-342.

Greco, L., Capri, E., Rustad, T. 2007. Biochemical responses in *Salmo salar* muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin. *Chemosphere* **68**: 564-571.

Haasch, M.L., Quardokus, E.M., Sutherland, L.A., Goodrich, M.S., Lech, J.J. 1993. Hepatic CYP1A1 induction in rainbow trout by continuous flowthrough exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. *Fundamental and Applied Toxicology* **20**: 72-82.

Haasch, M.L., Quardokus, E.M., Sutherland, L.A., Goodrich, M.S., Prince, R., Cooper, K.R., Lech, J.J. 1992. CYP1A1 protein and mRNA in teleosts as an environmental bioindicator: laboratory and environmental studies. *Marine Environmental Research* **34**: 139-145.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**: 7130-7139.

Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.P., Owen, R., Galloway, T.S. 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* **2**: 312-329.

Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., Bengtsson, B.-E. 2004. The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption II - kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquatic Toxicology* **70**: 311-326.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 936 pp.

Handy, R.D., Runnalls, T., Russel, P.M. 2002. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology* **11**: 467-479.

Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., Mc Master, M., Blaise, C. 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry* **17**: 448-451.

Harford, A.J., O'Halloran, K., Wright, P.F.A. 2006. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology* **20**: 562-573.

Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Taylor, T., Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 534-542.

Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A. 2004a. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* **69**: 95-105.

Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., Hegelund, T., Celander, M.C. 2004b. Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* **67**: 303-313.

Hecker, M., Thomas Sanderson, J., Karbe, L. 2007. Suppression of aromatase activity in populations of bream (*Abramis brama*) from the river Elbe, Germany. *Chemosphere* **66**: 542-552.

Henderson, A.R., Hamilton, J.D. 1986. The status of fish populations in the Clyde Estuary. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **90B**: 157-170.

- Hinck, J.E., Schmitt, C.J., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Bartish, T.M., Anderson, P.J., Coyle, J.J., Dethloff, G.M., Tillitt, D.E. 2006. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of The Total Environment* **366**: 549-578.
- Hinck, J.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Echols, K.R., Gross, T.S., May, T.W., Anderson, P.J., Coyle, J.J., Tillitt, D.E. 2007. Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Science of The Total Environment* **378**: 376-402.
- Holm, G., Norrgren, L., Andersson, T., Thuren, A. 1993. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology* **27**: 33-50.
- Holm, G., Lundström, J., Andersson, T., Norrgren, L. 1994. Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* **29**: 241-256.
- Huet, M. 1949. Aperçu des relations entre la pente and les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* **11**: 332-351.
- Huggett, R., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergmann, H.L. 1992. Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publisher, Chelsea, 347 pp.
- IFEN 2002. Les pesticides dans les eaux - Bilan annuel 2002. Institut Français de l'Environnement, pp. 23.
- Jakobsson, S., Borg, B., Haux, C., Hyllner, S.J. 1999. An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**: 79-85.
- Janssen, P.A.H., Lambert, J.G.D., Vethaak, A.D., Goos, H.J.T. 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of œstradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Aquatic Toxicology* **39**: 195-214.
- Jolly, C., Katsiadaki, I., Le Belle, N., Mayer, I., Dufour, S. 2006. Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology* **79**: 158-166.
- Jones, I., Lindberg, C., Jakobsson, S., Hellqvist, A., Hellman, U., Borg, B., Olsson, P.E. 2001. Molecular cloning and characterisation of spiggin. An androgen-regulated extraorganismal adhesive with structural similarities to Von Willebrand factor-related proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 17857-17863.
- Jones, J.W., Hynes, H.B.N. 1950. The age and growth of *Gasterosteus aculeatus* and , *Pigosteus oungitius* and *Spinachia vulgaris*, as shown by their otoliths. *Journal of Animal Ecology* **19**: 59-73.
- Kappus, H. 1987. Oxidative stress in chemical toxicity. *Archives of Toxicology* **60**: 144-149.
- Katsiadaki, I., 2007. The use of the stickleback as a sentinel and model species in ecotoxicology. In: Östlund-Nilsson, S., Mayer, I., Huntingford, F.A. (Eds.), *Biology of the three-spined stickleback*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 319-351.
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I. 2002a. The potential of the three-spined stickleback



(*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for œstrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research* **54**: 725-728.

Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Mayer, I. 2002b. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**: 1946-1954.

Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D., Scott, A.P. 2006. A sensitive, *in vivo* test for the detection of environmental anti-androgens, using the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environmental Health Perspectives* **114**: 115-121.

Katz, M. 1961. Acute toxicity of some organic insecticides to three-species of Salmonids and to the threespine stickleback. *Transactions of the American Fisheries Society* **90**: 264-268.

Kavitha, P., Venkateswara Rao, J. 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **87**: 182-188.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, E.L., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S.EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* **104**: 715-740.

Kawahara, R., Nishida, M. 2006. Multiple occurrences of spiggin genes in sticklebacks. *Gene* **373**: 58-66.

Kim, J.S., Ahn, T., Yim, S.K., Yun, C.H. 2002. Differential effect of copper II on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase : inhibition of cytochrome P450-catalysed reactions by copper II ion. *Biochemistry* **41**: 9438-9447.

Kime, D.E. 1984. The effect of cadmium on steroidogenesis by testes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Toxicology Letters* **22**: 83-88.

Kingsley, D.M., Peichel, C.L., 2007. The molecular genetics of evolutionary change in stickleback. In: Östlund-Nilsson, S., Mayer, I., Huntingford, F.A. (Eds.), *Biology of the three-spined stickleback*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 41-81.

Kirby, M.F., Smith, A.J., Rooke, J., Neall, P., Scott, A.P., Katsiadaki, I. 2007. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic Toxicology* **81**: 233-244.

Kirby, M.F., Allen, Y.T., Dyer, R.A., Feist, S.W., Katsiadaki, I., Matthiessen, P., Scott, A.P., Smith, A., Stentiford, G.D., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L., Waldock, M.J. 2004. Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: temporal trends, 1996 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**: 748-758.

Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G., Leah, R.T.R.T. 2004. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **58**: 356-364.

Kreimer, D.I., Golginova, E.A., Raves, M., Sussman, J.L., Silman, I., Weiner, L. 1994. A metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase generated by modification with organomercurials. *Biochemistry* **33**: 14407-14418.

- Lackner, R., 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. *In*: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds.), *Fish ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp. 203-224.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997a. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes and définitions. *In*: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 1-9.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997b. Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. *In*: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 393-401.
- Langston, W.J., Chesman, B.S., Burt, G.R., Pope, N.D., McEvoy, J. 2002. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality? *Marine Environmental Research* **53**: 263-293.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., Porte, C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* **196**: 247-257.
- Laville, N. 2005. Evaluation de l'(éco-)toxicité et du potentiel perturbateur endocrinien de contaminants aquatiques à l'aide de modèles cellulaires humains and de poisson. Université de Montpellier 2, pp. 193.
- Lemaire, P., Forlin, L., Livingstone, D.R. 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene,  $\beta$ -naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **36**: 141-160.
- Lewis, L., Handy, R.D., Cordy, B., Billingham, Z., Depledge, M.H. 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **8**: 351-368.
- Luengen, A.C., Friedman, C.S., Raimondi, P.T., Flegal, A.R. 2004. Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay. *Marine Environmental Research* **57**: 197-212.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2006a. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **143**: 36-41.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2006b. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **143**: 30-35.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology* **280**: R100-R107.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 1319-1330.
- Lv, X., Shao, J., Song, M., Zhou, Q., Jiang, G. 2006. Vitellogenic effects of 17 $\beta$ -estradiol in male Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*

*Part C: Toxicology & Pharmacology* **143**: 127-133.

- Machala, M., Nezveda, K., PetImageivalský, M., JaroImageová, A., PiaImageka, V., Svobodová, Z. 1997. Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of temperature, gender and capture stress. *Aquatic Toxicology* **37**: 113-123.
- Machala, M., Ulrich, R., Neca, J., Vykusova, B., Kolarova, J., Machova, J., Svobodova, Z. 2000. Biochemical monitoring of aquatic pollution: Indicators of dioxin-like toxicity and oxidative stress in the roach (*Rutilus rutilus*) and chub (*Leuciscus cephalus*) in the Skalice river. *Veterinarni Medicina* **45**: 55-60.
- Machala, M., Dusek, L., Hilscherova, K., Kubinova, R., Jurajda, P., Neca, J., Ulrich, R., Gelnar, M., Studnickova, Z., Holoubek, I. 2001. Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1141-1148.
- Marin, M.G., Matozzo, V. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 835-839.
- Martin, M.B., Voeller, H.J., Gelmann, E.P., Lu, J., Stoica, E.-G., Hebert, E.J., Reiter, R., Singh, B., Danielsen, M., Pentecost, E., Stoica, A. 2002. Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity. *Endocrinology* **143**: 263-275.
- Martinez-Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish : biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **15**: 75-88.
- Matés, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**: 83-104.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J., Mac Kee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., Mac Cume, D.C., Rattner, B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. *In*: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publisher, Chelsea, pp. 5-86.
- Mayer, I., Pall, M., 2007. Hormonal control of reproductive behaviour in the stickleback. *In*: Östlund-Nilsson, S., Mayer, I., Huntingford, F.A. (Eds.), *Biology of the three-spined stickleback*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, pp. 249-269.
- Mayon, N., Bertrand, A., Leroy, D., Malbrouck, C., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Goffart, A., Thome, J.-P., Kestemont, P. 2006. Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. *Science of The Total Environment* **367**: 715-731.
- Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mc Cant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**: 236-241.
- McCarthy, J.F., 1990. Implementation of a biomarker-based environmental monitoring program. *In*: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publisher, Boca Raton, pp. 429-440.
- McKinnon, J.S., Rundle, H.D. 2002. Speciation in nature: the threespine stickleback model systems. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 480-488.
- Melancon, M.J., Elcombe, C.R., Vodcnik, M.J., Lech, J.J. 1981. Induction of cytochrome P-450 and mixed-function oxidase activity by polychlorinated biphenylos and  $\beta$ -naphtoflavone in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **69**: 219-226.

- Miller, D.H., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Ankley, G.T. 2007. Linkage of biochemical responses to population-level effects : a case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 521-527.
- Minier, C., Eufemia, N., Epel, D. 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Biomarkers* **4**.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F. 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* **50**: 373-377.
- Monod, G. 1997. Les biomarqueurs d'exposition, Séminaire national "Les variables biologiques : des indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques". Ministère de l'Environnement, 2-3 novembre 1994, CEMAGREF Editions, pp. 145-148.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **143**: 141-149.
- Morrison, B.R.S., Wells, D.E. 1981. The fate of fenitrothion in a stream environment and its effect on the fauna, following aerial spraying of a Scottish forest. *The Science of The Total Environment* **19**: 233-252.
- Mourente, G., D'Áz-Salvago, E., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA/tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Osteichthyes, Sparidae). *Fish Physiology and Biochemistry* **23**: 337-351.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* **214**: 343-361.
- Narbonne, J.F., Daubèze, M., Clérandeau, C., Garrigues, P. 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels : application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* **4**: 415-424.
- National Research Council 1987. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives* **74**: 3-9.
- Neal, C., Robson, A.J. 2000. A summary of river water quality data collected within the Land-Ocean Interaction Study: core data for eastern UK rivers draining to the North Sea. *Science of The Total Environment* **251-252**: 585-665.
- Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R., Giesy, J.P. 2001. Effects of nonylphenol ethoxylate exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 510-522.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksøyr, A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**: 621-633.
- Nixon, S.C., Mainstone, C.P., Iversen, T.M., Kristensen, P., Jeppesen, E., Papathanassiou, E., Jensen, A., Pedersen, F. 1996. The harmonised monitoring and classification of ecological quality of surface waters in the European union. Final report. WRc Ref CO 4150, pp. 289.



- Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T.C., Balk, L. 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicology and Applied Pharmacology* **174**: 160-176.
- Noaksson, E., Linderöth, M., Bosveld, A.T.C., Norrgren, L., Zebuhr, Y., Balk, L. 2003. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *The Science of The Total Environment* **305**: 87-103.
- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* **163**: 447-463.
- Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., Belliard, J., Berrebi Dit Thomas, R., Porcher, J.P. 2002. Adaptation and validation d'un indice poisson (FBI) pour l'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau français. *Bulletin Français de la Pêche and de la Pisciculture* **365/366**: 405-433.
- O'Hare, D.B., Robotham, P.W.J., Gill, R. 1995. EROD measurement using post mitochondrial supernatant (PMS) in roach (*Rutilus rutilus* L.), a possible biomonitor for PAH contamination in the freshwater environment. *Chemosphere* **30**: 257-264.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**: 351-358.
- Ohtake, F., Takeyama, K.I., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. 2003. Modulation of oestrogen receptor signaling by association with activated dioxin receptor. *Nature* **423**: 545-550.
- Olson, D.L., Christensen, G.M. 1980. Effect of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase *in vitro*. *Environmental Research* **21**: 327-335.
- Orbea, A., Fahimi, H.D., Cajaraville, M.P. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and cell biology* **114**: 393-404.
- Osten, J.R.-v., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. 2005. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* **58**: 627-636.
- Östlund-Nilsson, S., Mayer, I., Huntingford, F.A. 2007. Biology of the three-spined stickleback. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 392 pp.
- Ozawa, T., Ueda, J., Shimazu, Y. 1993. DNA single strand breakage by copper (II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions. *Biochemistry and Molecular Biology International* **31**: 455-461.
- Ozcan Oruc, E., Usta, D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **23**: 48-55.
- Pacheco, M., Santos, M.A. 1998. Induction of liver EROD and eErythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **40**: 71-76.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **70**: 158-169.

- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **154**: 536-541.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology* **50**: 109-124.
- Parvez, S., Raisuddin, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**: 112-117.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., Lopez-Barea, J., Peinado, J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions* **145**: 191-199.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C.R., Braunbeck, T. 2004a. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**: 330-345.
- Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T. 2004b. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology* **68**: 277-291.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* **32**: 225-231.
- Peakall, D.W. 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News* **1**: 55-60.
- Pedersen, S.N., Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 1999. *In vivo* estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Science of The Total Environment* **233**: 89-96.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J., Lopez-Barea, J. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions* **98**: 267-282.
- Peichel, C.L., Nereng, K.S., Ohgi, K.A., Cole, B.L.E., Colosimo, P.F., Buerkle, C.A., Schluter, D., Kingsley, D.M. 2001. The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. *Nature* **414**: 901-906.
- Peichel, C.L., Ross, J.A., Matson, C.K., Dickson, M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Mori, S., Schluter, D., Kingsley, D.M. 2004. The Master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Current Biology* **14**: 1416-1424.
- Petrivalsky, M., Machala, M., Nezveda, K., Piacka, V., Svobodova, Z., Drabek, P. 1997. Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver : search for specific biochemical markers of chemical stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 1417-1421.
- Planas, C., Puig, A., Rivera, J., Caixach, J. 2006. Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction: Estimation of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Chromatography A* **1131**: 242-252.

- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Yeomans, W.E. 2002. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* **61**: 207-229.
- Pretti, C., Salvetti, A., Longo, V., Giorgi, M., Gervasi, P.G. 2001. Effects of  $\beta$ -naphthoflavone on the cytochrome P450 system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **130**: 133-144.
- Prygiel, J. 2002. Management of the diatom monitoring networks in France in 2000. *Journal of Applied Phycology* **14**: 19-26.
- Prygiel, J. 2003. Principales méthodes biologiques d'évaluation de la qualité des cours d'eau français. *Techniques - Sciences - Méthodes* **5**: 47-54.
- Prygiel, J., Rosso-darmet, A., Lafont, M., Lesniak, C., Durbec, A., Ouddane, B. 1999. Use of Oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediments of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia* **410**: 25-37.
- Rao, J.V. 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere* **65**: 1814-1820.
- Reddy, P.M., Philip, G.H. 1994. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **52**: 619-626.
- Regoli, F., Nigro, M., Bompadre, S., Winston, G.W. 2000. Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquatic Toxicology* **49**: 13-25.
- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno-Lamberti, C., Bompadre, S. 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin* **44**: 912-922.
- Ricard, A.C., Daniel, C., Anderson, P., Hontela, A. 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **34**: 377-381.
- Rodolico, S., Giovinazzo, R., Mosconi, M. 1997. Comparison between ELISAs and traditional analytical methods to determine pesticide pollution in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**: 644-650.
- Rodriguez-Ariza, A., Diaz-Méndez, F.M., Navas, J.I., Pueyo, C., Lopez-Barea, J. 1995. Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **25**.
- Roesijadi, G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **113**: 117-123.
- Roméo, M., Bennani, N., GnassiaBarelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* **48**: 185-194.
- Ronisz, D., Larsson, D.G.J., Forlin, L. 1999. Seasonal variations in the activities of selected

hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **124**: 271-279.

Ronis, D., Farmen Finne, E., Karlsson, H., Forlin, L. 2004. Effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane (HBCDD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and feral eelpout. *Aquatic Toxicology* **69**: 229-245.

Rose, J., Holbech, H., Lindholm, C., Norum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2002. Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinyestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **131**: 531-539.

Rotchell, J.M., Ostrander, G.K. 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B* **6**: 453-495.

Roussel, H., Joachim, S., Lamothe, S., Palluel, O., Gauthier, L., Bonzom, J.-M. 2007a. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: Individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* **82**: 272-280.

Roussel, H., Ten-Hage, L., Joachim, S., Le Cohu, R., Gauthier, L., Bonzom, J.-M. 2007b. A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: Primary producer community responses. *Aquatic Toxicology* **81**: 168-182.

Routledge, E.J., Sumpter, J.P. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 3280-3288.

Roy, J. 1997. Environmental contaminants encyclopedia : copper entry. National Park Service, Water Resources Divisions, pp. 99.

Sanchez, E., Colmenarejo, M.F., Vicente, J., Rubio, A., Garcia, M.G., Travieso, L., Borja, R. 2007. Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecological Indicators* **7**: 315-328.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E. 1997. Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**: 205-209.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E. 1998. In vivo inhibition of AChE activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to technical grade fenitrothion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **120**: 389-395.

Schaarschmidt, T., Jurss, K. 2003. Locomotory capacity of Baltic Sea and freshwater populations of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **135**: 411-424.

Schlenk, D., Perkins, E.J., Hamilton, G., Zhang, Y.S., Layher, W. 1996. Correlation of hepatic biomarkers with whole animal and population-community metrics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatical Sciences* **53**: 2299-2309.

Schmitt, C.J., Ellen Hinck, J., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Dethloff, G.M., Bartish, T.M., Coyle, J.J., Tillitt, D.E. 2005. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of The Total Environment* **350**: 161-193.

Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H., Knoerr, S., Braunbeck, T., Kalbfus, W., Negele, R.D.



2002. How estrogenic is nonylphenol?: A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology* **59**: 177-189.
- Scott, S.G., Pankhurst, N.W. 1992. Interannual variation in the reproductive cycle of the New Zealand snapper *Pagrus auratus* (Bloch and Schneider)(Sparidae. *Journal of Fish Biology* **41**: 685-696.
- Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jonsson, B., Schluter, D., Kingsley, D.M. 2004. Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* **428**: 717-723.
- Shi, H., Wang, X., Luo, Y., Su, Y. 2005. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* **74**: 365-371.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress : induction. In: Sies, H. (Ed.), Oxidative stress, oxidants and antioxidants. Academic Press, San Diego, pp. I-XV.
- Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* **27**: 916-921.
- Sokolowska, E., Kalamarz, H., Kulczykowska, E. 2004. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **139**: 365-369.
- Stanic, B., Andric, N., Zoric, S., Grubor-Lajsic, G., Kovacevic, R. 2006. Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **65**: 395-402.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination : enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Eds.), Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publisher, Chelsea, pp. 235-335.
- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133**: 435-442.
- Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Lafaurie, M. 1997. Effect of copper chloride *in vitro* and *in vivo* on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 214-219.
- Strahler, A.N. 1957. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions of the American Geophysical Union* **38**: 913-920.
- Sturm, A., Wogram, J., Hansen, P.D., Liess, M. 1999. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: 194-200.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M. 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 1607-1615.
- Sturm, A., Cravedi, J.P., Perdu, E., Baradat, M., Segner, H. 2001. Effects of prochloraz and

- nonylphenol diethoxylate on hepatic biotransformation enzymes in trout: a comparative *in vitro/in vivo*-assessment using cultured hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **53**: 229-245.
- Sturve, J., Berglund, Å., Balk, L., Broeg, K., Böhmert, B., Massey, S., Savva, D., Parkkonen, J., Stephensen, E., Koehler, A., Förlin, L. 2005. Effects of dredging in Göteborg harbor, Sweden, assessed by biomarkers in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 1951-1961.
- Sumpter, J.P. 1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicology Letters* **102-103**: 337-342.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* **103**: 173-178.
- Svecevicus, G. 2006. Acute toxicity of hexavalent chromium to European freshwater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **V77**: 741-747.
- Svecevicus, G., Vosyliene, M.Z. 1996. Acute toxicity of copper to common freshwater fishes of Lithuania. *Ekologija* **2**: 17-21.
- Szabo, A., Nemcsok, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kasa, P., Le Huu, H. 1992. The effects of pesticides on carp (*Cyprinus carpio*) acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **23**: 39-45.
- Tesseire, H., Vernet, G. 2000. Is the "Diuron Effect" due to a herbicide strengthening of antioxidative defenses of *Lemna minor*? *Pesticide Biochemistry and Physiology* **66**: 153-160.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldock, M.J. 2002. An assessment of *in vitro* androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**: 1456-1461.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2000. Development of an *in vivo* screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**: 2812-2820.
- Timbrell, J.A., Drapper, R., Waterfiel, C. 1994. Biomarkers in toxicology : new uses for old molecules. *Toxicology and Ecotoxicology News* **1**: 4-14.
- Tribskorn, R., Kähler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F. 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **6**: 57-73.
- Turnhout, E., Hisschemoller, M., Eijssackers, H. 2007. Ecological indicators: Between the two fires of science and policy. *Ecological Indicators* **7**: 215-228.
- Turnlund, J.R., 1999. Copper. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern nutrition in health and disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P. 1998. Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*. **28**: 319-361.
- Tyler, C.R., Van der Eerden, B., Jobling, S., Panter, G., Sumpter, J.P. 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology B* **166**: 418-426.
- Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H. 1999. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin.

*Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: 337-347.

Uguz, C., Iscan, M., Erguven, A., Isgor, B., Togan, I. 2003. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research* **92**: 262-270.

Uner, N., Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D. 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**: 241-245.

Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., Gervasi, P.G., Pretti, C. 2005. Effects of 17 $\beta$ -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* **75**: 293-305.

Van der Oost, R., Beyerb, J., Vermeulen, N. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57-149.

Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* **36**: 189-222.

Van der Oost, R., Vindimian, E., Van den Brink, J., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology* **39**: 45-75.

Van der Oost, R., Lopes, S.C.C., Komen, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N.P.E. 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): use of a bioactivation:detoxication ratio as a biotransformation index (BTI). *Marine Environmental Research* **46**: 315-319.

Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G. 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology* **10**: 415-421.

Vasseur, P., Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* **28**: 711-717.

Venkateswara Rao, J., Ghousia Begum, Jakka, N.M., K. Srikanth, K., Nageswara Rao, R. 2006. Prolonged effects of the insecticide profenofos on locomotor behavior in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Drug and Chemical Toxicology* **29**: 255 - 267.

Verslycke, T., Vandenberg, G.F., Versonnen, B., Arijs, K., Janssen, C.R. 2002. Induction of vitellogenesis in 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **132**: 483-492.

Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V. 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* **59**: 511-524.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfolli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins : a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology* **46**: 407-417.

- Vigano, L., Arillo, A., Melodia, F., Arlati, P., Monti, C. 1998. Biomarker responses in cyprinids of the middle stretch of the river Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 404-411.
- Wasson, J.G., Chandesris, A., Pela, H., Blanc, L. 2002. Les hydro-écorégions de France métropolitaine. Approche régionale de la typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Cemagref BEA/LHQ., pp. 190.
- Webb, D., Gagnon, M.M., Rose, T.H. 2005. Interannual variability in fish biomarkers in a contaminated temperate urban estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**: 53-65.
- WHO (World Health Organisation) 2002. IPCS Global assessment of the states-of-the-science of endocrine disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2, Geneva, Switzerland.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* **30**: 347-570.
- Wibe, A.E., Rosenqvist, G., Jenssen, B.M. 2002a. Disruption of male reproductive behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* exposed to 17 $\beta$ -estradiol. *Environmental Research* **90**: 136-141.
- Wibe, A.E., Billing, A., Rosenqvist, G., Jenssen, B.M. 2002b. Butyl Benzyl Phthalate affects shoaling behavior and bottom-dwelling behavior in Threespine Stickleback. *Environmental Research* **89**: 180-187.
- Williams, J.H., Farag, A.M., Stansbury, M.A., Young, P.A., Bergman, H.L., Petersen, N.S. 1996. Accumulation of HSP70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 1324-1328.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* **19**: 137-161.
- Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J., Sordyl, H. 2007. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **628**: 19-30.
- Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M. 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterostus aculeatus*) following short term exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1528-1531.
- Wootton, R.J. 1976. The biology of the sticklebacks. Academic Press, London New York San Francisco, 376 pp.
- Wootton, R.J. 1984. A functional biology of sticklebacks. Croom Helm, London Sidney, 265 pp.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S. 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin* **51**: 623-634.
- Yumino, K., Kawakami, I., Tamura, M., Hayashi, T., Nakamura, M. 2002. Paraquat- and diquat-induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. *Journal of Biochemistry* **131**: 565-570.
- Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C., Xue, Y.Q. 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**: 185-190.



## Références bibliographiques

Zhang, Y.S., Goksøyr, A., Andersson, T., Förlin, L. 1991. Initial purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from  $\beta$ NF-treated perch (*Perca fluviatilis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **98**: 97-103.

Zusterzeel, P.L.M., Rutten, H., Roelofs, H.M.J., Peters, W.H.M., Steegers, E.A.P. 2001. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta* **22**: 213-219.





## RESUME

L'objectif de ce travail était de caractériser le potentiel de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) comme espèce sentinelle utilisable pour la surveillance des milieux aquatiques à l'aide d'un ensemble de biomarqueurs. Dans ce but, des méthodes de dosage de biomarqueurs reflétant la métabolisation des xénobiotiques, le stress oxydant et ses effets, la neurotoxicité et la perturbation endocrinienne œstrogénique and androgénique ont été développées and validées. Nos résultats, obtenus en conditions contrôlées et sur le terrain, ont montré que les biomarqueurs mesurés chez cette espèce sont des paramètres sensibles et inductibles. Afin d'exploiter le plein potentiel des biomarqueurs, des valeurs basales mesurées sur un site de référence ont été établies and leur variabilité en fonction de facteurs biotiques et abiotiques tels que le sexe des poissons et la saison d'échantillonnage a été caractérisée. Leur utilisation sur le terrain renseigne sur les effets précoces de la contamination du milieu. Elle apporte également une information complémentaire à celle fournie par les analyses chimiques et les études populationnelles, et permet la discrimination des sites d'étude. Enfin, le développement d'un indice "biomarqueurs" permettant la synthèse des données recueillies offre des perspectives d'utilisation dans un contexte de gestion des milieux aquatiques.

**Mots clés :** épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus* L., écotoxicologie, biomarqueurs, surveillance de l'environnement.

## ABSTRACT

The aim of this work was to characterise the usefulness of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a sentinel fish species to assess aquatic environment contamination using a set of biomarkers. For this purpose, assays for biomarkers of xenobiotic metabolism, oxidative stress, neurotoxicity and estrogenic or androgenic endocrine disruption have been developed and validated. Our laboratory and field results show that investigated biomarkers are sensitive and inducible parameters. To run the full potential of biomarkers, basal values measured in reference site are established and their seasonal or gender variability is characterised. Field application provides information on early effects of contamination. Moreover, it provides complementary informations compared to chemical analysis and populational investigations and allows sampling site discrimination. At least, the development of a biomarker-based index allows the synthesis of collected data and offers a perspective for using biomarkers in aquatic ecosystem management.

Key words : three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., ecotoxicology, biomarkers, environmental biomonitoring.



**MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**  
**ECOLE DOCTORALE « SCIENCES DE LA NATURE ET DE L'HOMME » (ED 227)**

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

Discipline : **écotoxicologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Wilfried SANCHEZ**

**le, 06 septembre 2007**

**APPROCHE MULTI-BIOMARQUEURS CHEZ L'EPINOCHÉ À TROIS ÉPINES**  
**(*Gasterosteus aculeatus* L.) : UN MODÈLE POUR LA SURVEILLANCE DES**  
**ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES CONTINENTAUX**

\* \* \*

**ARTICLES ASSOCIÉS**



## Liste des articles

**Article 1 :** Sanchez W., Goin C., Brion F., Olsson P.E., Goksøyr A., Porcher J.-M. Development and validation of an ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against a synthetic peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* (soumise).

**Article 2 :** Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. (2005). Copper-induced oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : relationship with hepatic copper and zinc levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* , **19**, 177-183.

**Article 3 :** Sanchez W., Piccini B., Porcher J.-M. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* (soumise).

**Article 4 :** Sanchez W., Palluel O., Lagadic L., Aït-Aïssa S., Porcher J.-M. (2006). Biochemical effects of nonyphenol polyethoxylate adjuvant, diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Marine Environmental Research*, **62**, S29-S33.

**Article 5 :** Sanchez W., Aït-Aïssa S., Ditché J.-M., Palluel O., Porcher J.-M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, **16**, 279-287.

**Article 6 :** Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Multi-biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environmental Pollution* (en préparation).





## Article 1

Sanchez W., Goin C., Brion F., Olsson P.E., Goksøyr A., Porcher J.-M.  
Development and validation of an ELISA for the three-spined stickleback  
(*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against a synthetic peptide.  
*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and  
Pharmacology* (soumise).



**Development and validation of an ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide**

W. Sanchez <sup>a,\*</sup>, C. Goin <sup>a</sup>, F. Brion <sup>a</sup>, P.E. Olsson <sup>b</sup>, A. Goksøyr <sup>c,d</sup>, J. M. Porcher <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité d'Evaluation des Risques Ecotoxicologiques, BP2, F-60550, Verneuil-en-Halatte, France

<sup>b</sup> Department of Natural Science, Unit of Molecular Biology, Örebro University, SE-701 82 Örebro, Sweden,

<sup>c</sup> Biosense Laboratories AS, Thormøhlensgt. 55, N-5008 Bergen, Norway

<sup>d</sup> Department of Molecular Biology, Bergen University, N-5020 Bergen, Norway

\* Corresponding author. Tel. : +33 3 44 61 81 21 ; Fax: +33 3 44 55 67 67  
E-mail address : Wilfried.Sanchez@ineris.fr (W. Sanchez)

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop an enzyme linked immunosorbent (ELISA) assay to quantify spiggin in the three-spined stickleback. Spiggin is a glue protein produced in the kidney of male three-spined stickleback under the control of androgens during the breeding period. Disturbances of spiggin production in male fish and abnormal induction of spiggin in female fish are considered as valuable biomarkers of exposure to (anti-)androgenic chemicals. Polyclonal antibodies against a peptide sequence of spiggin (HRD 16) were used and the specificity of the antibodies was verified by Western blotting and direct ELISA experiments. By using HRD 16 antibodies and spiggin standard preparation, a competitive ELISA was set-up and validated. This assay appears sensitive, with a detection limit of 0.01 U/ml, and specific, as shown by the competition curves, obtained by serial dilution of male and female kidney homogenates, that were parallel to the spiggin standard curves. The ability of the spiggin ELISA to quantify spiggin induction was achieved by exposing male and female three-spined sticklebacks to 0.1 and 1 µg/L of methyltestosterone. The results show a significant dose-dependent induction of spiggin in methyltestosterone-exposed female fish compared to controls.

Keywords : three-spined stickleback, spiggin, androgens, ELISA

## 1. Introduction

Several man-made chemicals and natural substances present in the environment are able to disturb the normal physiology and endocrinology of organisms (Arukwe and Goksøyr, 1998). These substances, termed endocrine-disrupting chemicals (EDCs), have been defined as “ exogenous substances that cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary to changes in endocrine function ” (Organization for Economic Cooperation and Development, 1997). Much research has been conducted on estrogenic endocrine disrupters and their environmental occurrence and effects on aquatic organisms are well described. However, less data are available on androgenic and anti-androgenic EDCs able to mimic or antagonise, respectively, the effects of the endogenous androgenic hormones.

Any studies have reported in vitro (anti-)androgenic activity in surface waters and sediment extracts of samples collected in rivers and estuaries (Allen et al., 2002; Blankvoort et al., 2005; Jenkins et al., 2001; Soto et al., 2004). The application of “ toxicity identification evaluation ” (TIE) approach which combines bioassays and chemical analysis, allowed to identify the androgenic compounds implicated in aquatic environment contamination such as androstenedione (Jenkins et al., 2001). Moreover, several effluents of domestic and industrial water treatment plants discharging into environment, exhibited also androgenic activities linked to the occurrence of various androgenic EDCs including testosterone, dehydrotestosterone, androsterone, trembolone and many others (Allen et al., 2002; Blankvoort et al., 2005). This contamination is liable for adverse effects in wildlife range from masculinisation of females of the common mosquito fish Gambusia affinis (Cody and Bortone, 1997) to imposex in rock shell and several buccinidae species (Matthiessen and Gibbs, 1998). In light to the data available on occurrence of androgens in environment and their effects on aquatic species, further studies are required to bridge the gap of knowledges on the molecular, physiological, morphological and behavioural effects of androgenics EDCs. For this purpose, the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus), a small teleost fish, robust to contamination, inhabiting in both northern hemisphere seawater and freshwater, can be considered as a valuable model fish species. Indeed, during its breeding period, male stickleback exhibits androgen-dependent secondary sexual characters including development of kidney hypertrophy, nuptial coloration, territorial and nest-building behaviour. At biochemical level, the kidney hypertrophies under the control of androgens to produce an hydrophobic protein named spiggin. Spiggin is a 203-kDa cysteine-rich glycoprotein synthesized, during the breeding period only, in the kidney of male fish and then secreted into the urinary bladder where it is assembled from three subunits prior its utilisation as a

structural thread for nest building (Jakobsson et al., 1999). The spiggin gene is present, but remains silent, in female and juvenile stickleback. Following stimulation by androgens or their mimics, spiggin is readily induced. Because spiggin synthesis appears to be androgen-specific, the induction of spiggin in female or immature fish can serve as a sensitive and reliable biomarker for exposure to androgen receptor agonists in laboratory (Katsiadaki et al., 2002) and field studies (Allen et al., 2002). Spiggin can also be used as end-point for the rapid and sensitive screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupting compounds tested on stickleback kidney cell culture assay (Bjorkblom et al., accepted manuscript ; Jolly et al., 2006). Moreover, an in vivo test, based on measurement of spiggin reduction in androgen-treated female sticklebacks, has been developed for the detection of environmental anti-androgens (Katsiadaki et al., 2006).

The present paper describes the development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on utilisation of antibodies against a synthetic peptide specific to three-spined stickleback spiggin sequence.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Fish maintenance and spiggin induction**

Three-spined sticklebacks and nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*) used in this study were male and female adults sampled, outside their breeding period, from uncontaminated outdoor lotic mesocosms located at INERIS (Verneuil en Halatte, France). Prior to the onset of experiments, fish were acclimated in conditions for one week. The water temperature was  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and the photoperiod was a light/dark cycle of 8/16 hours. Male and female zebrafish (*Danio rerio*), a fish species in which spiggin synthesis is not observed, were sampled from a laboratory stock and acclimated to a temperature of  $26.5^{\circ}\text{C} \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  and a 14/10 hours light/dark photoperiod. During this period, water was completely renewed and food was supplied every other day.

Spiggin induction. Fish were randomly distributed in glass aquaria and exposed, during 21 days, to 20  $\mu\text{g/L}$  of waterborne  $17\alpha$ -methyltestosterone ( $17\alpha$ -MT) dissolved in dimethylsulfoxide (0.002 % of DMSO by aquarium). The  $17\alpha$ -MT concentration was chosen to allow a strong spiggin induction. The control group received no added MT and DMSO. During this exposure, water was completely renewed and food was supplied every other day.

### **2.2. Standard and samples preparation**

After exposure, fish were sacrificed, measured, weighed and sexed. Kidneys were dissected and weighed. Kidneys were dissolved in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 8 M urea, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) by heating at 100°C for two hours. Dissolved kidneys were stored at –80°C prior to spiggin quantification. Spiggin purification by chromatographic method is difficult because it is an hydrophobic protein that reforms into glue. However, the use of induced biological material as a standard for coating and standard curve dilutions, appears as a useful principle previously (Katsiadaki et al., 2002). Hypertrophied kidneys from breeding male sticklebacks exposed to 20  $\mu$ g 17 $\alpha$ -MT /L during 21 days (see part 2.1) were pooled and dissolved (1:10 [w:v]) in denaturing buffer using the same method as with the samples. To minimise non-specific interactions between standard and antibodies, dissolved kidneys were centrifuged at 14 000 x g, 4°C for 15 min. The supernatant was aliquoted by 20  $\mu$ L, assigned to 50 000 U/mL and stored at –80°C.

### **2.3. Synthetic peptide and peptide antibody**

A peptide (HRD-16) common to the spiggin subunits was synthesized by Innovagen AB (Lund, Sweden). The peptide sequence, HRDELIRDSKLHDHRC, corresponded to amino acid 161 to 176 in the three-spined stickleback spiggin protein and was used to produce polyclonal antiserum (Agrisera, Vännäs Sweden). IgG (0.9 mg/mL) was purified from rabbit polyclonal antiserum against HRD-16 peptide (as described by Nilsen et al. (2004)).

### **2.5. Western Blot analysis**

Samples were run in 10 % SDS-PAGE and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane followed by a blocking step with 5 % BSA in PBS overnight at 4°C. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with anti-HRD-16 IgG diluted 1:80 000 in PBS, 0.05% Tween 20, 2 % BSA (PBS-T-BSA), and then incubated for 1 h at room temperature with a HRP-conjugated goat anti-rabbit serum (Bio-Rad Laboratories) diluted 1:2 000 in PBS-T-BSA. Membranes were washed and developed using luminol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates (Amersham Biosciences).

### **2.6. Direct ELISA**

Samples diluted in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) were coated in microtiter plates (96-well Nunc Maxisorp ; Nunc, Roskilde, Denmark) overnight at 4°C. The plates were

then blocked for 1 h with 2 % BSA in PBS and then incubated 1 h, at room temperature, with primary antibody diluted in PBS, 1 % BSA. After this time, HRP-conjugated goat anti-rabbit serum diluted in PBS, 1 % was added for 1 hours at 37°C. The peroxidase activity was revealed by adding tetramethyl benzidine enzyme substrate (Interchim, France). After a 30 min incubation at 37°C, the enzyme reaction was stopped by addition of 50 µL of 1 M phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). The absorbency was read at 450 nm using a microplate reader (Power Wave<sub>x</sub> – Bio-Tek instruments).

## **2.7. Stickleback spiggin competitive ELISA**

This competitive ELISA for three-spined stickleback spiggin is based on a competition for the anti-HRD-16 antibodies between spiggin coated on the wells of a microtiter plate and free spiggin in the sample or standard solutions. The procedure described here has been optimized. Coating. Microtiter plates (96-well Nunc Maxisorp ; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 100 µL per well of stickleback spiggin standard at a concentration of 5 U/mL in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). The nonspecific binding (NSB) was determined using two wells coated without spiggin. The plates were incubated overnight at 4°C.

Standard and sample preincubation. Spiggin standard was serially diluted by a factor two in PBS, from 0.2 to 100 U/mL. Similarly, samples were serially diluted from 1: 50 to 1:50 000. Diluted solution were mixed (1:1) with primary antibody solution previously diluted to 1:10 000 to obtain a final concentration of 1:20 000. The maximal binding ( $B_0$ ) was determined using a sample containing only antibody mixed with the buffer to make a final concentration identical to the antibody concentration present in all other samples. The mixed solutions were incubated at room temperature during 30 min and subsequently incubated overnight at 4°C.

Blocking. The coated plates were washed three times with 200 µL per well of PBS-T and blocked with the same volume of PBS, 2% BSA for 1 h at room temperature.

Primary and secondary antibody incubation. The blocked plates were washed three times with PBS-T. After this washing step, 100 µL of standard/antibody or sample/antibody preincubates were introduced into the wells. The plates were sealed and incubated during 2 hours at room temperature. After this time, the plates were washed another three times with the same protocol. 100 µL of HRP-conjugated goat anti-rabbit serum were added in all wells at a dilution of 1:3 000 in PBS, 1% BSA. Plates were sealed and incubated at 37°C for 2 hours.

Development. Microtiter plates were washed five times with PBS-T and the peroxidase activity was revealed by adding 100 µL of tetramethyl benzidine enzyme substrate. The



enzyme reaction was stopped after 30 min by addition of 50 µL of 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and the absorbance was read at 450 nm using a microplate reader.

Result calculation. The mean of the absorbance values for the NSB wells was subtracted from the values of all other wells on the same plate. The standard or sample dilution percentage binding was calculated using the following equation :

$$\frac{B_i}{B_o} = \left( \frac{\text{standard or sample absorbance}}{\text{maximal binding absorbance}} \right) \times 100$$

The B<sub>i</sub>/B<sub>0</sub> standard data were fitted using least-squares method in a four-parameters logistic model and the equation was used to calculate the sample spiggin concentration.

## 2.8. Validation of ELISA method

Parallelism between standard and dilution curve. Kidney samples from control and MT-exposed male and female three-spined sticklebacks were serially diluted and the parallelism between the competition curves obtained with the samples and the spiggin standard curves was assessed.

Reproducibility. Precision and reproducibility of the ELISA method were determined using a one-way analysis of variance as described by Caporal-Gautier et al. (1992a;b). Briefly, five independent spiggin standard curves were made in duplicate and in four independent assays. Each curve were fitted with a four-parameters logistic model. Intra- and interassay coefficients of variation (CV) were calculated using the following equations and expressed as a percentage for the spiggin concentration at 90, 80, 50, and 20% binding.

$$CV \text{ intraassay} = \left( \frac{\text{intra group variance}^{0.5}}{\text{general mean}} \right) \times 100$$

$$CV \text{ interassay} = \left( \frac{\text{total variance}^{0.5}}{\text{general mean}} \right) \times 100$$

Detection and quantification limits. The detection and quantification limits (DL and QL respectively) were calculated using the following relationships (Caporal-Gautier et al., 1992a; b).

$$DL = \overline{B_o} - 3.SD \text{ and } QL = \overline{B_o} - 10.SD$$

or SD represents the standard deviation associated to the mean of B<sub>0</sub> (n = 48).

Matrix effect. The interferences generated by the renal tissue on the spiggin quantification were assessed. Briefly,  $\frac{Bi}{Bo}$  values for kidney homogenates from non-exposed zebrafish diluted 1:1, 1:10, 1:20, 1:25, 1:40, 1:50, and 1:100 were determined.

## **2.9. Usefulness of ELISA method to quantify spiggin induced by graded concentration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone**

A total number of 120 three-spined sticklebacks were randomly distributed in 4 glass aquaria and exposed, during 21 days, to 0, 0.1 and 1  $\mu$ g waterborne 17 $\alpha$ -MT /L. The 17 $\alpha$ -MT was dissolved in DMSO added in aquarium to 0.002 %. Two control groups were also monitored during this experiment including an absolute control that received water only and a solvent control that received DMSO in the same proportion as exposed groups. During this exposure, water was completely renewed every day and food was supplied every other day. After exposure, fish were sacrificed, measured and weighed. Kidney was dissected, weighed and stored in liquid nitrogen prior spiggin quantification. Nephro-somatic index (NSI) was calculated as (kidney weight / fish weight) x 100. Spiggin was quantified in dissolved kidneys of sticklebacks using the developed ELISA method. All samples were analysed in duplicate and the results were expressed as Unit of spiggin/g of fish and the induction factors were calculated.

## **2.10. Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation and all statistical analysis were performed with SPSS 14 software. Normal distribution and homoscedasticity of data were verified using respectively Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. When data sets didn't have a normal distribution and/or homogeneity of variance, the data was log-transformed, using  $F(x) = \log(1+x)$ , prior to parametric analysis. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post-hoc test was performed to test the position of significant differences between exposure conditions ( $\alpha=0.05$ ). Male and female differences were searched using a t-test ( $\alpha=0.05$ ).

## **3. Results**

### **3.1. Antibody characterisation**

The ELISA method developed in this work is based on the use of antibodies against synthetic peptide from the spiggin sequence (Jones et al., 2001). Prior to ELISA development and

validation, the specificity of antibodies (anti-HRD-16) were assessed. The antibodies were initially characterised by western blot analysis using induced male kidney and liver and non-induced female kidney from stickleback and also BSA and HRD-16 peptide. The results showed that anti-HRD-16 antibody binds proteins only in induced male stickleback kidney. No significant cross-reaction or non-specific binding were observed in other samples (Fig. 1A).

The antibodies were also characterised by direct ELISA analysis using HRD-16 peptide and various other biological samples with or without spiggin (Fig. 1B). The results indicated that anti-HRD-16 antibodies cross-react with HRD-16 peptide and kidney from induced male three-spined stickleback with a decrease of the signal proportional to the dilution of kidney sample in the range 1:4 000 – 1:250 000. All other samples registered an absorbance below 0.5, providing evidence for the specificity of anti-HRD-16 for spiggin.

### **3.2. ELISA development and validation**

In a first step, several standard spiggin coating concentrations and primary antibody dilutions were used in a criss-cross serial dilution test. Three combinations characterised by an optimal absorbance (between 1.5 and 2), a low spiggin coating concentration and a high dilution rate of antibody were selected (Fig. 2). To evaluate the performance of each assay condition, standard curves were generated (data not show). After this step, one combination based on 5 U/mL coating concentration and 1:20 000 primary antibody final dilution was selected to establish and validate the competitive ELISA.

The assay condition described, consistently produced a standard curve with a working range of 0.5–6.6 U/mL (80–20% binding) in diluted samples, with 50% of binding at approximately 1.8 U/mL. The specificity of the assay was assessed by comparing the slopes of standard curves and serially diluted samples (Fig. 3). The kidney of breeding male and 17 $\alpha$ -MT - exposed female sticklebacks showed a good parallelism with the spiggin standard within the working range of the assay. Conversely, HRD 16 peptide showed a lack of parallelism with the other samples which reflected a significant variation of cross-reaction of between antibodies and natural or synthetic ligands (data not shown). Under these conditions, intra- and inter-assay coefficients of variation were calculated for the spiggin standard curve at 90 %, 80 %, 50 % and 20 % binding. The results are presented in Table 1. All coefficients of variation were satisfactory with a value below 20 % reflecting the reproducibility and the repeatability of the method. The detection and quantification limits of this assay were 0.01 and 1.09 U/mL respectively.

The matrix effect linked to other fish proteins or higher concentration of denaturing buffer was assessed. Diluted kidney samples of non-exposed zebrafish containing no spiggin were used to determine  $\frac{Bi}{Bo}$  values. The results presented in Table 2 show that dilutions of sample below 1:25 provide a quantifiable signal. Hence, to avoid the matrix effect, a dilution of sample of at least 1:25 was chosen for the routine assay. Consequently, the detection and quantification limits for spiggin in kidney samples were 0.25 and 27.25 U/mL respectively.

### 3.3. Spiggin induction by graded 17 $\alpha$ -MT concentrations

In this experiment, NSI and spiggin concentration was not gender dependent parameters. However, male and female data were treated separately in light to strong physiological differences between both genders (Fig. 4). Non-exposed sticklebacks exhibited low values of NSI ( $0.3 \pm 0.2$  % for absolute control females to  $0.6 \pm 0.3$  % for solvent control males) and no significant differences was observed between both control groups. After 21 days of exposure to 17 $\alpha$ -MT, fish showed a significant increase of NSI values for both genders and both tested concentrations ( $1.1 \pm 0.3$  % for 0.1 $\mu$ g/L exposed females to  $1.7 \pm 0.3$  % for 1.0 $\mu$ g/L exposed males). However, the response of NSI appeared as not dose-dependent and no significant differences was recorded between both 17 $\alpha$ -MT exposed groups. Spiggin level in non-exposed sticklebacks was not detectable but 20 % of male and female fish exposed for 21 days to 0.002% DMSO exhibited a low level of spiggin with  $24.2 \pm 19.0$  and  $15.3 \pm 7.8$  U/g of fish respectively. Mean measured concentrations of spiggin in males exposed to 0.1 and 1  $\mu$ g/L of 17 $\alpha$ -MT were respectively  $1303.5 \pm 903.7$  U/g of fish and  $7645.9 \pm 1111.3$  U/g of fish. In female, the measured concentrations were  $2005.2 \pm 2027.2$  U/g of fish and  $5776.1 \pm 2362.1$  U/g of fish.

## 4. Discussion

Several methods have been described to assess the androgenic response of stickleback. Among them, the measurement of kidney epithelium height (KEH) in histological sections (Borg et al., 1993) and NSI determination (Sokolowska et al., 2004) provides a valuable information on androgen effects in kidney but appears as few sensitive. Very specific and sensitive methods to detect changes in spiggin mRNA, such as Northern blot analysis (Jones et al., 2001) and by real-time polymerase chain reaction (Geoghegan et al., 2005) have been developed. However, the response levels measured with these assays may not necessarily correlated with spiggin synthesis. ELISA have also been set up to measure spiggin level in

stickleback kidney (Katsiadaki et al., 2002). This methodology appears to be very sensitive, less expensive than molecular biology assays and less time consuming than KEH measurement. Hence, we have focused on the establishment and validation of an immunoassay to detect and quantify spiggin in three-spined stickleback using antibodies raised against a synthetic peptide of the spiggin protein.

Competitive ELISA development requires the availability of a standard and an antibody specific of the protein of interest. Unfortunately, spiggin is a highly hydrophobic protein not easy to purify to obtain a pure and quantifiable standard, hence no spiggin purified standard and specific antibodies were commercially available. To bridge this methodological problem, Katsiadaki et al. (2002) developed an elegant strategy based on utilisation of a pool of hypertrophied kidneys as standard to obtain dilution curve, and a pool of nest material for coating the plates. This process diminishes interference between antibodies raised against spiggin from stickleback bladder, and coated material but not with other component of biological samples and could induce overestimation of spiggin concentration. In the present work, we developed and validated an ELISA based on an alternative strategy. The selected antibodies were raised against a synthetic peptide. The chosen peptide is a 16 amino acid sequence located in each subunits of the three-spined stickleback spiggin. Hence, the peptide-specific antibodies exhibited an high specificity as observed by Western Blot and direct ELISA analysis. Anti-HRD-16 antibodies showed a cross-reaction with spiggin of three-spined stickleback only. Indeed, no cross-reaction was noticed with non-induced kidneys of females and with liver of induced males, indicating that antibodies recognised an androgen-induced protein synthesised in kidney of three-spined stickleback. A lack of cross-reaction was also noticed with induced kidneys of nine-spined stickleback. As most Gasterosteidae, nine-spined sticklebacks produces spiggin used in gluing plant material to form a nest (Wootton, 1976). However, the lack of reactivity with anti-HRD-16 antibodies could be explained by the difference observed in spiggin amino acid sequence for these two fish species (i.e. 81 % similarity) and the lack of selected peptidic sequence in nine-spined stickleback (McDermott et al, unpublished data). Similarly, no cross-reaction was observed with sample from zebrafish : a fish species in which spiggin is not expressed. The high specificity of anti-HRD-16 antibodies for the spiggin of three-spined stickleback, allowed to use a preparation of hypertrophied kidneys from 17 $\alpha$ -MT induced male three-spined stickleback as standard to obtain a steep standard curve and to coat the plates.

The spiggin standard used for this ELISA is a pool of hypertrophied kidneys from androgenised male three-spined stickleback dissolved in denaturing buffer and assigned an arbitrary value of 50 000 U/mL. A strong concentration of 17 $\alpha$ -MT, a high affinity ligand for the androgen receptor widely used in aquaculture to produce predominately male populations (Pandian and Sheela, 1995) and able to induce spiggin (Katsiadaki et al., 2002), was used for fish androgenisation. The utilisation of biological material containing spiggin as standard has been previously described by Katsiadaki et al. (2002) and appears as a valuable method which mitigates the lack of absolute standard. Compared to ELISA previously set up and validated, the utilisation of a standard easily produced after fish exposure to a potent androgen in laboratory conditions allows to obtain this at all period of the year conversely to nest material that is available only during the breeding period.

The performance of the ELISA was validated through a single-laboratory validation based on international guidelines for validation of analytical methods (Eurachem, 1998; Thompson et al., 2002). Several parameters including linear range of the standard curve (i.e. calibration), intra- and inter-assay variation (i.e. precision and repeatability respectively), detection and quantification limits for standard and samples but also matrix effect were assessed for the developed spiggin ELISA. The minimal acceptable performances for each parameter were not clearly defined for spiggin ELISA. However, validation of vitellogenin ELISA was well described and the performances for each end-point of validation procedure were defined (Goksøyr et al., 2003). With intra- and inter-assay coefficients of variation below 20 % and a 13-fold working range between 0.5 and 6.6 U/mL, the developed ELISA in the present study appears as a valuable method to detect spiggin at 0.01 U/mL and to quantify spiggin at 1.09 U/mL. Biological components of kidney samples and denaturing buffer used for sample preparation can interfere with the quantification of spiggin and a minimum dilution factor must be determined to avoid this problem. This matrix effect was measured by analysing homogenised kidneys from androgen-treated male zebrafish rather than kidneys from non-treated female three-spined stickleback. These samples were really devoided of any spiggin since, to our knowledges, zebrafish is not able to synthesise this protein. Conversely, previous studies which investigated androgenic response of stickleback reported detectable levels of spiggin in some non-exposed exposed female and juvenile fish (Andersson et al., 2007; Hahlbeck et al., 2004; Katsiadaki et al., 2002) hence it can't be possible to determine accurately the matrix effect that could be overestimated. It was found that diluting kidney samples by a minimum of 1:25 avoided the matrix effects. In this context, the detection and quantification limits calculated for the standard were multiplied by the determined dilution

factor. Consequently, the detection and quantification limits for a sample were respectively to 0.25 and 27.2 U/mL.

The developed and validated ELISA was used to quantify spiggin in control and 17 $\alpha$ -MT-exposed stickleback. In the present work, non-exposed male and female sticklebacks maintained in non-reproductive status were characterised by low NSI values in accordance with the data previously reported in non-breeding sticklebacks (Sokolowska et al., 2004). In these fish, no spiggin level was detected. In male stickleback, spiggin induction is correlated closely with the increase of 11-ketotestosterone level during the breeding season (Mayer et al., 1990). Outside breeding period, levels of 11-ketotestosterone and other androgens such as testosterone, 11 $\beta$ -hydroxytestosterone, 11-ketoandrostenedione and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione are low (Borg, 1994; Mayer et al., 1990) and could explain the lack of spiggin synthesis as shown in our study. Surprisingly, a low spiggin induction was detected in sticklebacks exposed for 21 days to 0.002 % of DMSO. This induction was quantified in 20 % of samples and the measured values were  $24.2 \pm 19.0$  and  $15.3 \pm 7.8$  U/g of fish in male and female respectively. However, no NSI increase was recorded in fish from solvent control group compared to absolute control that confirmed the high sensitivity of spiggin measurement. The review by Hutchinson et al. (2006) showed clearly that DMSO carrier has the potential of modulating the endocrine system. A recent study by Mortensen and Arukwe (2006) suggested that DMSO may act as an estrogen receptor agonist using a salmon hepatocyte in vitro system. Whether this also is true for the androgen receptor needs to be investigated.

In sticklebacks exposed to 0.1 and 1  $\mu$ g 17 $\alpha$ -MT /L, the present assay allowed to quantify spiggin inductions generated by both tested concentrations. Katsiadaki et al. (2002) reported a rough low observed effect concentration (LOEC) of 0.1  $\mu$ g 17 $\alpha$ -MT /L using spiggin induction as end-point. At this concentration, we observed a 54 and 131-fold induction in male and female sticklebacks respectively. Evidence for spiggin induction in sticklebacks exposed to 0.1  $\mu$ g/L for 21 days suggest that spiggin provides a valuable end-point to assess the androgenic effects in fish. Hence, this assay completed a set of biochemical biomarkers set-up in our laboratory and successfully applied to investigate biochemical responses of wild sticklebacks (Sanchez et al., 2007). Moreover, our results indicate that, out of breeding period, male and female sticklebacks exhibited no spiggin basal level and are characterised by an equal sensitivity to 17 $\alpha$ -MT for each tested concentration. Consequently, both fish gender



can be used without distinction to assess androgenic effects of chemicals if sticklebacks are collected during non reproductive period. Hence, this result allows to decrease the fish number used for laboratory and field experiments.

In summary, a sensitive and robust competitive spiggin ELISA has been developed using antibodies against synthetic peptide and kidney samples from 17 $\alpha$ -MT -induced male three-spined sticklebacks as standard. This assay allows the quantification of spiggin in kidney of androgen-exposed stickleback with a high specificity and allows assessment of androgenic activity of chemicals in laboratory and to explore androgenic exposure in field-sampled sticklebacks.

### Aknowledgement

This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de la Recherche et du Développement AP-2004) and by Biosense Laboratories AS.

### References

- Allen, Y., Balaam, J., Bamber, S., Bates, H., Best, G., Begnell, J., Brown, E., Craft, J., Davies, J.M., Depledge, M.H., Dyer, R.A., Feist, S., Hurst, M.R., Hutchinson, T.H., Jones, G., Jones, M.B., Katsiadaki, I., Kirby, M.F., Leah, R., Matthiessen, P., Megginson, C., Moffat, C.F., Moore, A., Pirie, D., Robertson, F., Robinson, C.D., Scott, A.P., Simpson, M.G., Smith, A., Stagg, R.M., Struthers, S., Thain, J.E., Thomas, K.V., Tolhurst, L., Waldock, M.J., Walker, P., 2002. Final report : Endocrine Disruption in the Marine Environment (EDMAR), pp. 67.
- Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., Orberg, J., 2007. Effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* 83, 33-42.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia* 83, 225-241.
- Bjorkblom, C., Olsson, P.-E., Katsiadaki, I., Wiklund, T., 2007. Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* doi: 10.1016/j.cbpc.2007.05.004.



- Blankvoort, B.M.G., Rodenburg, R.J.T., Murk, A.J., Koeman, J.H., Schilt, R., Aarts, J.M.M.J.G., 2005. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 263-272.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 109, 219-245.
- Borg, B., Antonopoulou, E., Andersson, E., Carlberg, T., Mayer, I., 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, Gasterosteus aculeatus. *Can. J. Zool.* 71, 2327-2329.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R., 1992a. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. I. Méthodologie. S.T.P. Pharma Pratiques 2-4, 205-226.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R., 1992b. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. II. Exemples d'application. S.T.P. Pharma Pratiques 2-4, 227-239.
- Cody, R.P., Bortone, S.A., 1997. Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 429-436.
- Eurachem, 1998. The fitness for purpose of analytical methods. <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>.
- Geoghegan, F., Katsiadaki, I., Williams, T.D., Lyons, B.P., Chipman, J.K., 2005. Differential gene expression in the three-spined stickleback Gasterosteus aculeatus in response to a mixture of pollutants, 13th international symposium Pollutant Responses in Marine Organisms, Alessandria, Italy.
- Goksøyr, A., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Nilsen, B.M., 2003. On the need for a standardized set-up for validation studies of fish vitellogenin assays as an endpoint in endocrine disruptor testing and screening – a proposal. <http://www.biosense.com/Docs/GoksoyrEtal2003.pdf>.
- Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., Bengtsson, B. E., 2004. The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption II- kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquat. Toxicol.* 70, 311-326.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69-92.
- Jakobsson, S., Borg, B., Haux, C., Hyllner, S.J., 1999. An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 79-85.

- Jenkins, R., Angus, R.A., McNatt, H., Mike Howell, W., Kemppainen, J.A., Kirk, M., Wilson, E.M., 2001. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1325-1331.
- Jolly, C., Katsiadaki, I., Le Belle, N., Mayer, I., Dufour, S., 2006. Development of a stickleback kidney cell culture assay for the screening of androgenic and anti-androgenic endocrine disrupters. *Aquat. Toxicol.* 79, 158-166.
- Jones, I., Lindberg, C., Jakobsson, S., Hellqvist, A., Hellman, U., Borg, B., Olsson, P.E., 2001. Molecular cloning and characterisation of spiggin. An androgen-regulated extraorganismal adhesive with structural similarities to Von Willebrand factor-related proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 17857-17863.
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Mayer, I., 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (Gasterosteus aculeatus) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1946-1954.
- Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D., Scott, A.P., 2006. A sensitive, in vivo test for the detection of environmental anti-androgens, using the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus). *Environ. Health Persp.* 114, 115-121.
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37-43.
- Mayer, I., Borg, B., Schulz, R., 1990. Seasonal changes in and effect of castration/androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 23-30.
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2006. Dimethyl sulfoxide is a potent modulator of estrogen receptor isoforms and xenoestrogen biomarker responses in primary culture of salmon hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 99-103.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., Goksøyr, A., 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 621-633.
- Organization for Economic Cooperation and Development, 1997. Draft detailed review paper: Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals, Paris, France.
- Pandian, T.J., Sheela, S.G., 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture* 138, 1-22.

- Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Palluel, O., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279-287.
- Sokolowska, E., Kalamarz, H., Kulczykowska, E., 2004. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus): towards an endocrine calendar. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 365-369.
- Soto, A.M., Calabro, J.M., Prechtel, N.V., Yau, A.Y., Orlando, E.F., Daxenberger, A., Kolok, A.S., Guillette, L.J., Jr., le Bizec, B., Lange, I.G., Sonnenschein, C., 2004. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving Cattle Feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environ. Health Persp.* 112, 346-352.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC technical report. *Pure Applied Chem.* 74, 835-855.
- Wootton, R.J. 1976. The biology of the sticklebacks. Academic Press, London New York San Francisco, 376 pp.

Fig. 1. Characterisation of HRD-16 antibodies. **A** : Western blot with HRD-16 antibodies diluted to 1 : 80 000 and induced and noninduced samples from different fish species. **B** : Direct ELISA performed with induced and noninduced samples from different fish species diluted to 1 :10 000 and various dilutions of HRD-16 antibodies. Lane 1 : HRD-16 peptide ( $\mu\text{g}$ ) ; lane 2 : MT-induced male three-spined stickleback (kidney) ; lane 3 : non-induced female three-spined stickleback (kidney) ; lane 4 : MT-induced male three-spined stickleback (liver) ; lane 5 : MT-induced zebrafish (kidney) ; lane 6 : non-induced zebrafish (kidney) ; lane 7 : MT-induced male nine-spined stickleback (kidney) ; lane 8 : non-induced female nine-spined stickleback (kidney).

Fig. 2. Determination of optimal concentration of spiggin and primary antibody (HRD-16) for the development of the spiggin ELISA. The arrows indicate the three combinations characterised by an optimal absorbance (between 1.5 and 2), a low spiggin coating concentration and a high dilution rate of antibody selected prior the evaluation the performance of each assay condition.

Fig. 3. Cross-reaction of kidney samples from MT-induced male and female three-spined stickleback and noninduced male, in the three-spined stickleback spiggin ELISA.

$B_i/B_0$  = percentage binding.

Fig. 4. NSI and spiggin levels in kidneys from male (black bars) and female (open bars) sticklebacks non-exposed (absolute control and solvent control) and exposed for 21 days to two concentrations of 17 $\alpha$ -methyltestosterone (MT) under semistatic conditions. Males and females were analysed separately and treatments shown with the same letter do not differ significantly from each other ( $\alpha=0.05$ ). nd was not detectable.

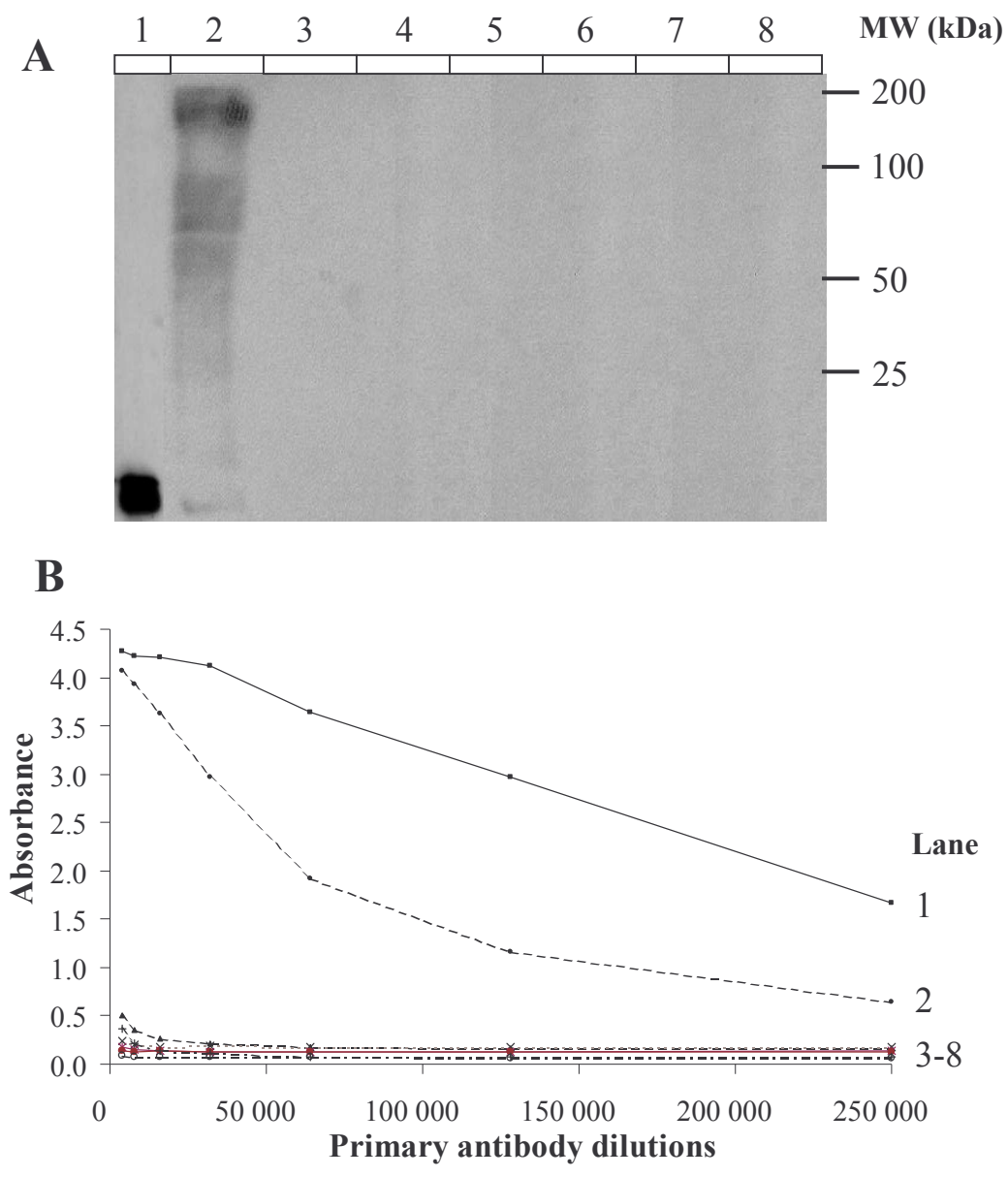


Fig. 1

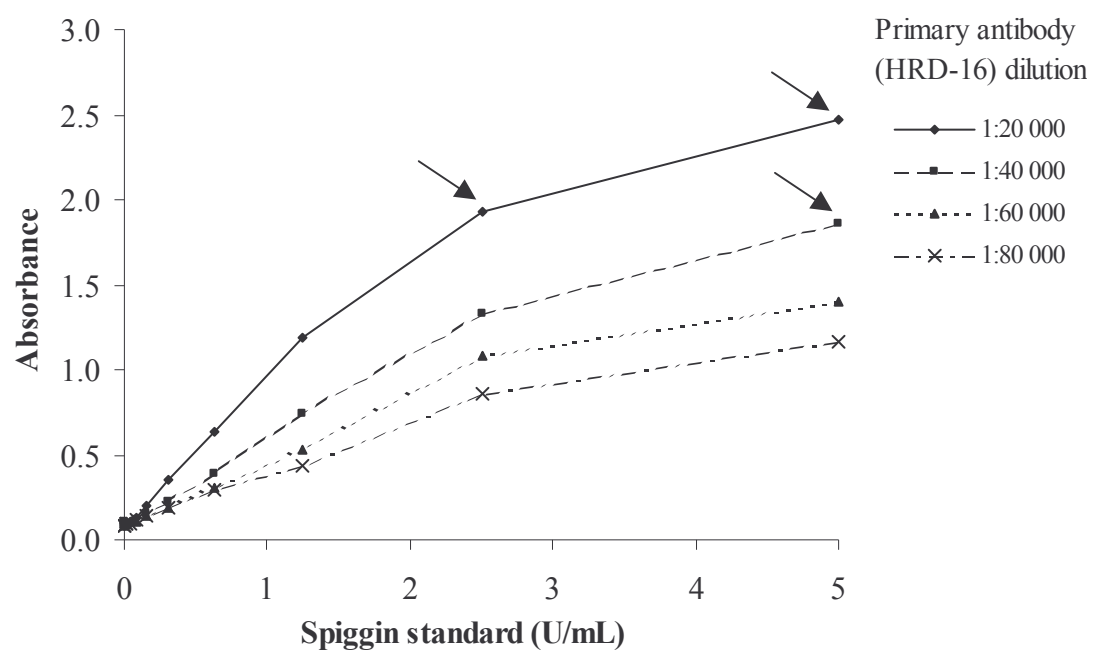


Fig. 2

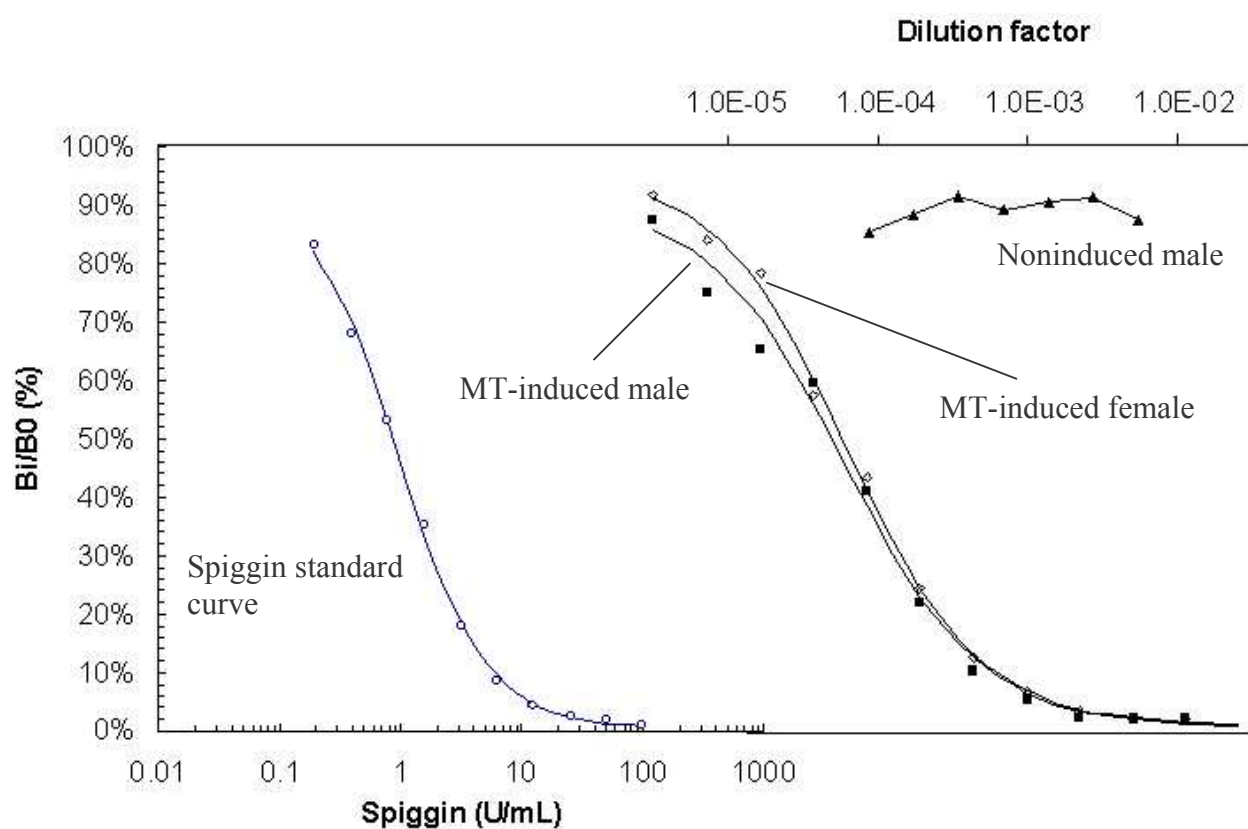


Fig. 3

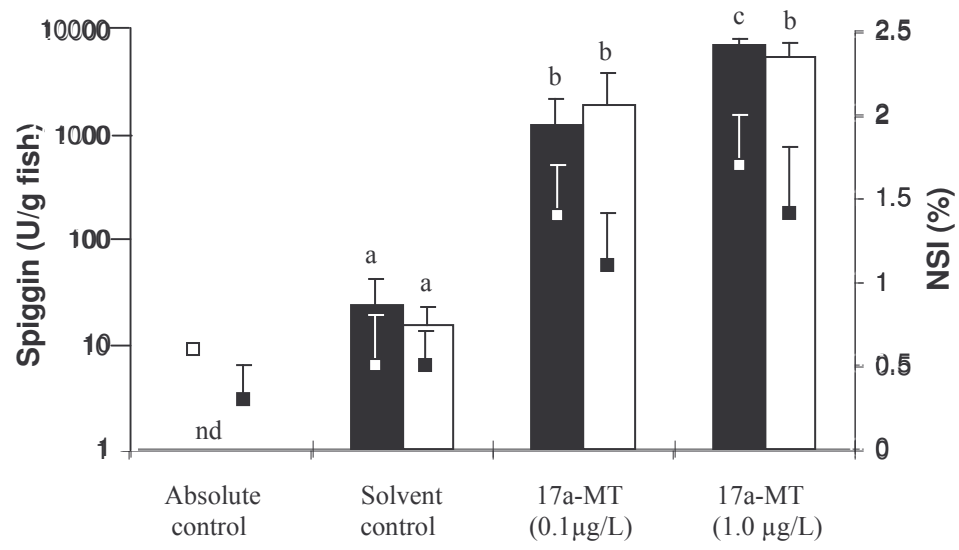


Fig. 4



Table 1. Characteristics of the three-spined stickleback spiggin enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with a combination of 5 U/mL of spiggin and antibody dilution of 1:20 000. CV = coefficient of variation.

	Binding			
	90 %	80 %	50 %	20 %
Spiggin concentration (U/mL)	0.5	0.8	1.7	4.3
CV intra-assay (%)	17.3	13.5	9.7	5.6
CV inter-assay (%)	19.2	15.1	12.2	11.2

Table 2. Determination of matrix effect using sample of zebrafish diluted 1:1, 1:10, 1:20, 1:25, 1:40, 1:50 and 1:100. In the routine assay, samples were diluted 1:25 to avoid the matrix effect.  
 $B_i/B_0$  = percentage binding.

Dilution of zebrafish sample	$B_i/B_0$ values (%)
1:1	52 %
1:10	61 %
1:20	68 %
1:25	84 %
1:40	89 %
1:50	97 %
1:100	100 %

## Article 2

Sanchez W., Palluel O., Meunier L., Coquery M, Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. (2005). Copper-induced oxidative stress biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) : relationship with hepatic copper and zinc levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **19**, 177-183.



## Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels

Wilfried Sanchez<sup>a</sup>, Olivier Palluel<sup>a</sup>, Laurent Meunier<sup>b</sup>, Marina Coquery<sup>b</sup>,  
Jean-Marc Porcher<sup>a</sup>, Sélim Aït-Aïssa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Direction des risques chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France*

<sup>b</sup> *Unité de chimie analytique et environnementale, Direction des risques chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France*

Received 24 March 2004; accepted 9 July 2004

Available online 25 August 2004

### Abstract

The aim of this study was to characterise biomarker responses in three-spined sticklebacks exposed to copper. For this purpose, adult sticklebacks were exposed for 3 weeks to copper sulphate at 0, 25, 100 and 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  as Cu. At days 4, 8, 12 and 21, several parameters were measured including liver, gonad and spleen somatic indexes, hepatic biomarkers (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST) and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)) and hepatic copper and zinc concentrations. Copper induced a rapid and transient increase of antioxidant enzymes and a depletion of glutathione content during the first 8 days of exposure. Significant copper and zinc accumulation in fish liver were observed for the two higher exposure concentrations after 8 and 12 days, respectively. This study showed that copper induced an oxidative stress in fish liver before significant metal accumulation in the liver could be detected, suggesting the involvement of differential mechanisms in copper uptake and metabolism. Three-spined stickleback appears to be a sensitive model to study oxidative stress induced by metals.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Bioaccumulation; Biomarkers; Copper; Liver; Oxidative stress; Three-spined stickleback

### 1. Introduction

Mining activity, domestic waste emission or application of fertilizers and pesticides induce contamination of aquatic ecosystems by heavy metals. Among them, copper is a widespread pollutant found in surface waters at concentrations up to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Roy, 1997). It is also a particular pollutant because it is an essential trace element for living organisms, used as a co-factor for structural and catalytic properties of a variety of enzymes involved in the biological processes of growth, development and maintenance (Turnlund, 1999). Although this metal is a required element, high concentrations appear to be toxic to freshwater organisms with no

observed effect concentrations comprised between 4 and 120  $\mu\text{g L}^{-1}$  as reported for 14 fish species (Grosell et al., 2002). The freshwater predicted no effect concentration (PNEC) was recently evaluated for copper and the value of 1.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  was proposed (GRNC, 2002). Copper toxicity varies with water chemistry, temperature and fish species and induces various damages that can lead to the death of the organisms.

At the cellular level, copper can interfere with several metabolic pathways and thereby induce different cellular responses. This metal has been well described as a promoter of oxidative stress by catalysing the formation of highly reactive oxygen species (ROS), such as  $\text{HO}^\bullet$  radical through the Haber–Weiss reaction (Matés, 2000) and generating peroxidation of membrane lipids (Chan et al., 1982) and DNA alterations (Ozawa et al., 1993). Copper also binds

\* Corresponding author. Tel.: +33 344 55 65 11; fax: +33 344 55 67 67.  
E-mail address: [Selim.Ait-Aissa@ineris.fr](mailto:Selim.Ait-Aissa@ineris.fr) (S. Ait-Aïssa).

thiol-containing molecules such as glutathione (GSH) or metallothioneins (MT), where it is trapped (Roesijadi, 1996). Direct interaction of copper with proteins can be the source of enzyme inhibition such as cytochrome P450-associated monooxygenase activities (Kim et al., 2002).

This study was conducted to characterise the response of several hepatic biomarkers, including oxidative stress and xenobiotic transformation biomarkers, in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) exposed to sublethal copper concentrations and to determine whether these responses are related to copper accumulation in the target organ. Three-spined stickleback is present in all aquatic ecosystems in northern hemisphere and is an abundant fish species in both unpolluted and polluted areas. Recently, this fish has been used as a model organism to study bioaccumulation of organic compounds (Andersson et al., 2001; Falandysz et al., 1998) and metals (Bervoets et al., 2001), as well as biochemical biomarker responses to various xenobiotics such as pesticides (Sturm et al., 2000), organic compounds (Holm et al., 1993) or environmental estrogens and androgens (Katsiadaki et al., 2002; Pottinger et al., 2002). To our knowledge, no study has investigated the effect of metals on the biomarker responses in three-spined stickleback. Hence, as its use as a sentinel species for aquatic pollution biomonitoring has been suggested (Handy et al., 2002; Pottinger et al., 2002), there is still a need to characterise biomarker responses to widespread environmental contaminants in this fish species.

The biomarkers that we measured were enzymatic [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)] and non-enzymatic (GSH) antioxidants, as well as two biotransformation enzymes [7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST)] involved in oxidative metabolism of xenobiotics (Van der Oost et al., 2003). Furthermore, copper measurement in liver was used to link metal accumulation with biochemical responses. In addition, hepatic zinc content was measured in order to evaluate whether MT induction occurred during our experiment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Exposure protocol

Male and female adult sticklebacks (3.4–6.8 cm) were collected in outdoor artificial streams during spring 2003 and maintained in denitrated water (ionic composition: K, 3.0 mg L<sup>-1</sup>; Mg, 11.7 mg L<sup>-1</sup>; Na, 10.9 mg L<sup>-1</sup>; Si, 5.8 mg L<sup>-1</sup>; Ca, 55.5 mg L<sup>-1</sup>; Al < 0.01 mg L<sup>-1</sup>; Fe < 0.02 mg L<sup>-1</sup>; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, <0.1 mg L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 0.3 mg L<sup>-1</sup>; Cl<sup>-</sup>, 58 mg L<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0.45 mg L<sup>-1</sup>; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 11.7 mg L<sup>-1</sup>; alkalinity, 367 mg L<sup>-1</sup> as CaCO<sub>3</sub>; pH, 8.35 ± 0.05) for 3 weeks prior to experimentation. Fish were randomly distributed in four groups of 30 fish and exposed to waterborne copper sulphate in semi-static conditions with complete water re-

Table 1

Actual copper concentrations measured in the water throughout the experiment<sup>a</sup>

Nominal copper concentration (μg L <sup>-1</sup> )	Measured copper concentration (μg L <sup>-1</sup> )
0	<0.05
25	24.6 ± 1.5
100	91.6 ± 2.8
200	176.8 ± 2.3

<sup>a</sup> Measurements were performed in water sampled 2 h after each water renewal. Data are mean ± S.E. (n = 7).

newal and food supply every 3 days. The concentrations of copper were chosen to be representative of environmental concentrations encountered in polluted freshwaters (25 and 100 μg Cu L<sup>-1</sup>) with an additional higher concentration (200 μg Cu L<sup>-1</sup>) that was expected to exert subtoxic events. The control group received no added copper. Water copper concentrations in each aquarium were controlled by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Ultima 2, Jobin Yvon) and showed that actual copper concentrations were stable between two water changes (data not shown) and throughout the experiment (Table 1). The water temperature was 13.5 ± 0.4 °C and the photoperiod was a light/dark cycle of 8 h/16 h.

### 2.2. Sampling, biometrical and biochemical analysis

At days 0, 4, 8, 12 and 21, six fish per concentration were randomly sampled. Fish were sacrificed, measured and weighed. Liver, gonads and spleen were dissected and weighed to calculate the corresponding somatic index according to the following equation: organ somatic index = (organ weight/fish weight) × 100.

Liver was homogenized in 200 μL of ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) supplemented with 20% (v/v) glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a protease inhibitor. The homogenate was centrifuged at 10,000 × g, 4 °C, for 15 min and the supernatant was used for biochemical assays. Total proteins were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma) as a standard. SOD, CAT and GPx were assessed according to the methods of Paoletti et al. (1986), Babo and Vasseur (1992) and Paglia and Valentine (1967), respectively; using purified bovine enzymes (Sigma) as standards. For GST activity determination, chlorodinitrobenzene was used as substrate (Habig et al., 1974) and purified GST from equine liver (Sigma) as a standard. GSH and oxidised glutathione (GSSG) concentrations were measured by the spectrophotometric method of Vandeputte et al. (1994). All measures were carried out at room temperature in microtiter plates, using a microplate reader (Power Wave<sub>x</sub>–Bio-Tek instruments). 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase activity was determined by a fluorimetric method in black microplates (Flammarion et al., 1998) using a microplate spectrofluorimeter reader (Victor<sup>2</sup> Wallac, Perkin-Elmer).

### 2.3. Chemical analysis

Hepatic copper and zinc concentrations were determined after digestion of homogenized liver using suprapure nitric acid (Carlo Erba) at 120 °C for at least 2 h (1 mL of nitric acid per 20 µL of sample). The volume was then adjusted to 20 mL with de-ionized water. Metal concentrations were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Ultima 2, Jobin Yvon). Quality assurance controls based on certified reference materials of the National Research Council of Canada (DOLT-2, dogfish liver) were carried out to validate this procedure.

### 2.4. Statistics

All statistical calculations were performed with SPSS 10.1 software. Since data were not normally distributed (Liliefors' test) and/or exhibited heterogeneous variances (Levene's test), non-parametric tests (Kruskal–Wallis ANOVA and Mann–Whitney *U*-test) were performed (significant for  $P < 0.05$ ). Data are reported as mean  $\pm$  standard error.

## 3. Results

During this experiment, low mortality was observed for fish exposed to 200 µg L<sup>-1</sup>. Four out of 30 fish died during the first 5 days and one died at day 16. This mortality prevented the analysis of hepatic copper concentration and biomarkers at day 21. At this concentration, the surviving fish appeared stressed as indicated by a dark colour, a lower mobility and a loss of appetite. Those behaviour alterations were not observed in the other groups.

A significant bioaccumulation of copper was observed in liver of fish exposed to 200 µg L<sup>-1</sup> for 8 and 12 days and to 100 µg L<sup>-1</sup> for 12 days (Fig. 1A). At day 21, a trend is noted for copper accumulation at 100 µg L<sup>-1</sup> although this was not statistically significant. An increase of zinc concentration in liver was noticed after 12 days of exposure to 100 and 200 µg L<sup>-1</sup>, whereas a transient increase of zinc level was noticed after 4 days at 25 µg L<sup>-1</sup> (Fig. 1B).

No significant variation of somatic indexes was observed for any copper concentration or any sampling time (data not shown), whereas several differences were observed at the biochemical level.

As seen in Fig. 2, a rapid and transient induction of antioxidant enzymes was measured within the first week of copper exposure. SOD activity was clearly increased at day 4, although this effect was statistically significant only at 25 µg L<sup>-1</sup> and returned to the basal level at day 8 (Fig. 2A). CAT activity was characterised by a general increase for all copper treatments after 4 days (Fig. 2B). This increase was maintained up to 12 days in fish exposed to 200 µg L<sup>-1</sup>. GPx activity showed a significant increase after 8 days in fish exposed to 200 µg L<sup>-1</sup> and returned to the basal level at day 12 (Fig. 2C).

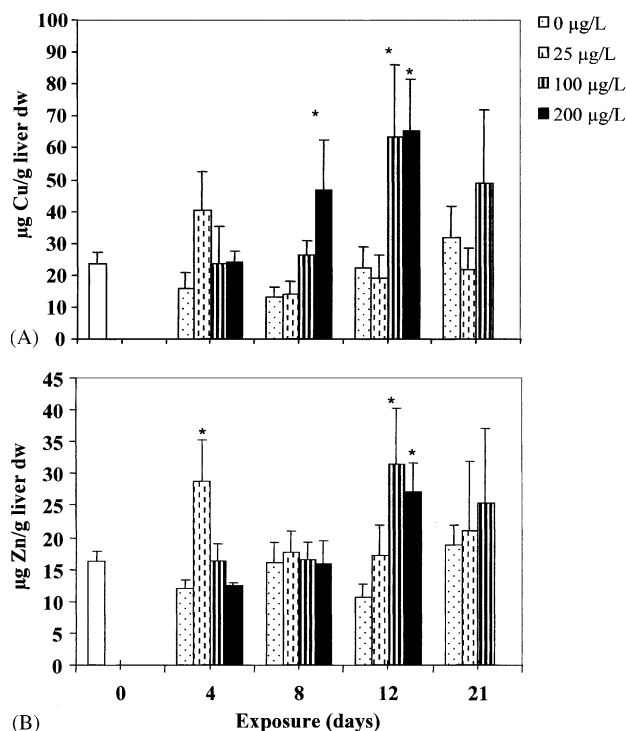


Fig. 1. Effect of copper treatment on hepatic copper (A) and zinc (B) concentration. Data represent mean  $\pm$  S.E. of the measurements on six fish per group except for the 100 µg L<sup>-1</sup> on day 21 ( $n = 5$ ). (\*), statistically different from  $t_0$  control ( $P < 0.05$ ).

In control fish, total and oxidised GSH were characterised by an important variation of the basal level during the experiment (Fig. 3). Nevertheless, some effects of copper can be seen for this biomarker. A significant decrease of both total and oxidised GSH content was noticed in fish exposed to 200 µg L<sup>-1</sup> after 4 and 8 days of exposure (Fig. 3A and B). This depletion was not accompanied by an impairment of glutathione redox status as no effect on GSSG/GSH ratio was noticed (not shown). After 12 days of exposure, this effect was reversed and fish exposed to the highest copper concentration presented a total glutathione level significantly higher than control fish.

For EROD activity measured in fish exposed 21 days to 100 µg L<sup>-1</sup>, a significant inhibition was observed as compared to the control group (Fig. 4A). For the other concentrations and sampling time, no significant variation of this enzyme was detected as compared to the control group. The hepatic GST activity did not vary significantly with respect to either copper concentration or time of exposure (Fig. 4B).

## 4. Discussion

Despite the low mortality observed after 4 days at the highest copper concentration, our exposure conditions were clearly sublethal. For three-spined stickleback exposed to copper sulphate, the 50% lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) were reported to be 2.78, 1.96 and 1.59 mg Cu L<sup>-1</sup> after 24, 48

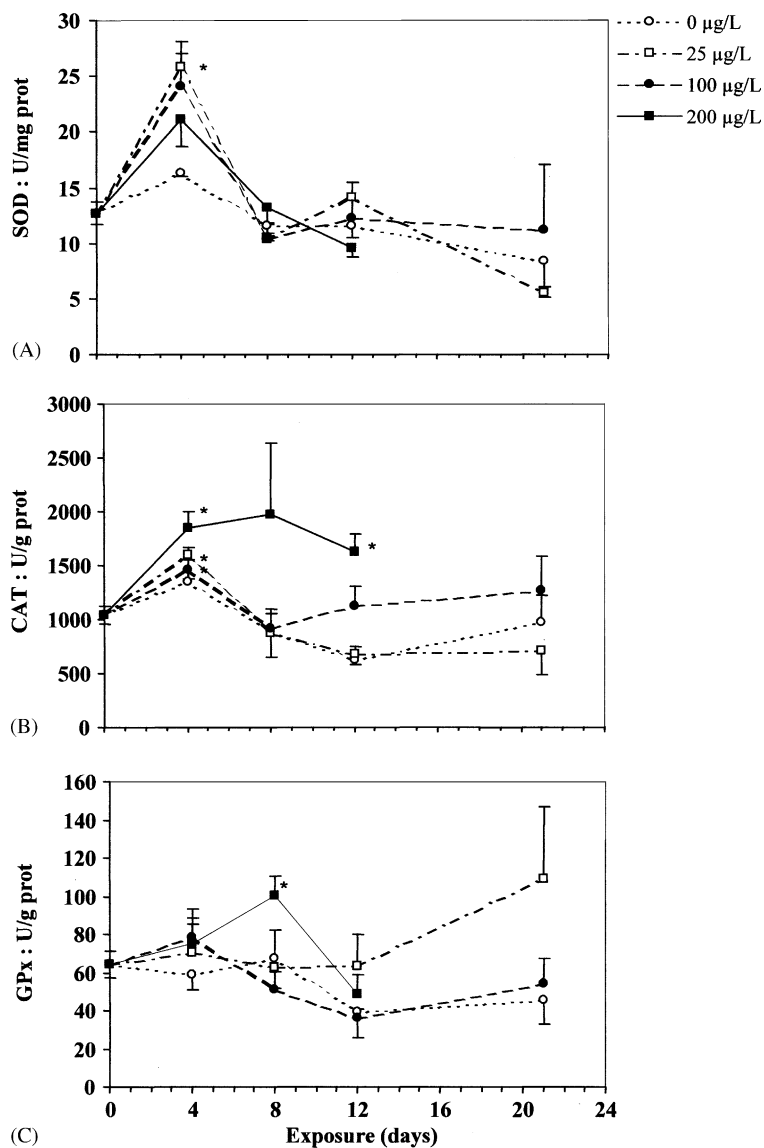


Fig. 2. Effect of copper treatment on hepatic SOD (A), catalase (B) and GPx (C) activities. Data represent mean  $\pm$  S.E. of the measurements on six fish per group except for the 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  on day 21 ( $n = 5$ ). (\*), statistically different from  $t_0$  control ( $P < 0.05$ ).

and 72 h, respectively (Svecevicus and Vosyliene, 1996), which are much higher than the concentrations used in our study. However, comparison is rather difficult, since copper toxicity is highly dependent on several abiotic factors, such as pH, water hardness and alkalinity, that influence copper speciation. The physico-chemical forms, in which the metal is present in the aquatic environment (free ionic  $\text{Cu}^{2+}$ , dissolved inorganic or organic complexes, associated with particular matter) will indeed determine its bioavailability for the organisms. In our study, the slightly basic conditions (pH 8.35) together with the elevated water hardness (367  $\text{mg L}^{-1}$  as  $\text{CaCO}_3$ ) and very low dissolved organic carbon (DOC) suggest that a major fraction of the copper in the water is present as inorganic complexes (mainly  $\text{CuCO}_3$ ) and only a small fraction as free  $\text{Cu}^{2+}$ . Nevertheless, our results showed that these inorganic copper complexes are also

bioavailable to the organisms, since significant accumulation and biochemical responses to copper were observed.

At day 12, copper did accumulate at similar levels in the liver of fish exposed either to 100 or 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 1). Copper concentrations in liver measured during this laboratory exposure are in accordance with the levels observed in three-spined stickleback sampled in the field (Bervoets et al., 2001). This may indicate that saturation for copper accumulation occurred right from 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  and is in agreement with the fact that, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the time to half saturation for copper in the liver is 6 days (McGeer et al., 2000). At day 12, the bioconcentration factor ( $\text{BCF} = ([\text{Cu}]_{\text{exposed}} - [\text{Cu}]_{\text{control}})/[\text{Cu}]_{\text{water}}$ ) reached 401 and 208 in the 100 and 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  groups-exposed fish, respectively, which are in the same order of magnitude to those previously reported for zebrafish (*Brachydanio rerio*) exposed



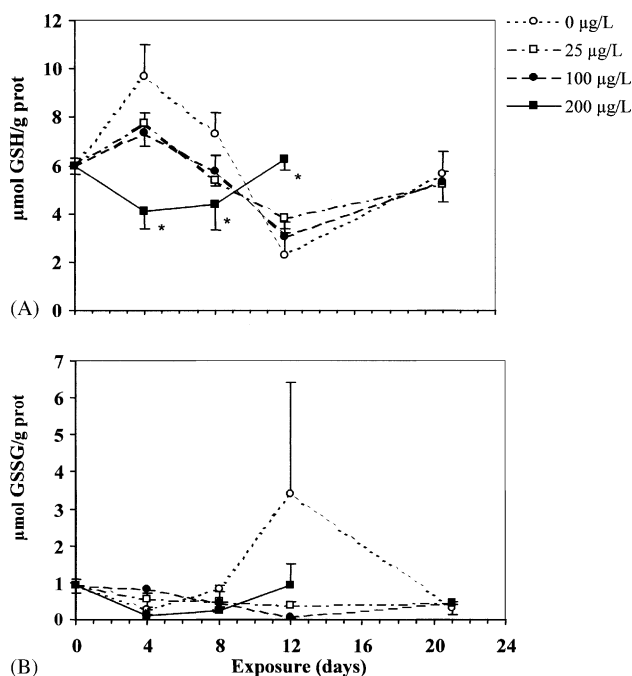


Fig. 3. Effect of copper treatment on activities of total glutathione (A) and oxidised glutathione (B) content. Data represent mean  $\pm$  S.E. of the measurements on six fish per group except for the 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  on day 21 ( $n = 5$ ). (\*), statistically different from 0  $\mu\text{g L}^{-1}$  control ( $P < 0.05$ ).

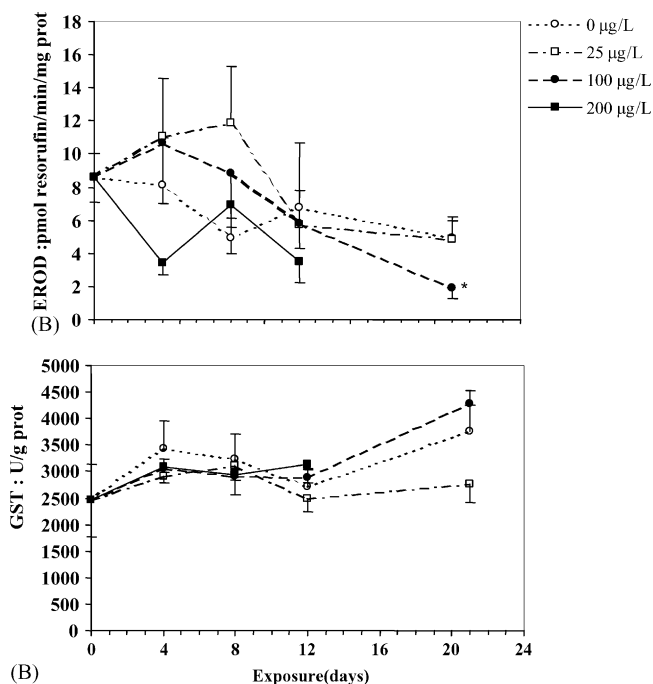


Fig. 4. Effect of copper treatment on biotransformation enzyme activities: EROD (A) and GST (B). Data represent mean  $\pm$  S.E. of the measurements on six fish per group except for the 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  on day 21 ( $n = 5$ ). (\*), statistically different from  $t_0$  control ( $P < 0.05$ ).

for 14 days to copper (Paris-Palacios et al., 2000). These relatively low BCF, as compared to those reported for other metals such as Cd, may reflect the existence of homeostatic regulation of copper levels in the liver (McGeer et al., 2000).

The biomarker responses in stickleback were in accordance with the known capacity of copper to promote oxidative stress and to modulate enzymatic and non-enzymatic antioxidant expressions in fish tissues, as shown by a rapid and transient increase of SOD, CAT and GPx enzymes and by a decrease of total GSH. In fish, antioxidant enzymes have been shown to be either induced or inhibited by copper, depending on the dose, the species and/or the route of exposure. Zebrafish submitted to 40 and 140  $\mu\text{g Cu L}^{-1}$  as  $\text{CuSO}_4$  presented a clear-cut induction of CAT and GST within 2 weeks of waterborne copper exposure (Paris-Palacios et al., 2000). Conversely, in carp, CAT and GST were inhibited after 96 h of exposure to 100 and 250  $\mu\text{g Cu L}^{-1}$  as  $\text{CuSO}_4$  (Dautremepuits et al., 2002). Using intra-peritoneal injection of copper, SOD inhibition was reported in carp after 48 h (Varanka et al., 2001), while this enzyme was rapidly induced in gilthead seabream (*Sparus aurata*; Pedrajas et al., 1995).

In stickleback, the rapid response of both enzymatic and non-enzymatic antioxidants is in line with the view that copper is able to act through different oxidative mechanisms, including generation of ROS and direct interaction with intracellular thiols.

SOD are metalloenzymes that play a key role in the defence against ROS by transforming superoxide anions into hydrogen peroxide (Yim et al., 1993). The total SOD activity that we measured in the post-mitochondrial fraction corresponds mainly to the Cu, Zn-SOD activity, the major isoform in the cytosol, nucleus and peroxisomes. Thus, the rapid and marked drop in SOD activity at day 4 may result from direct binding of the metal to the enzyme, as previously suggested in fish (Pedrajas et al., 1995). In addition, induction of CAT and GPx indicated that copper induces (hydro)peroxide species in the liver. It is likely that the resulting  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced from increased SOD activity was the source for subsequent increase of CAT activity after the fourth day of copper exposure (Fig. 2B). Moreover, the known capacity of copper to oxidize membrane lipids in fish (Pedrajas et al., 1995), together with the role of GPx in the detoxification of lipoperoxidation products (Matés, 2000), may also account for the observed increase of this enzyme at day 8 (Fig. 2C). Unfortunately, the induction of lipid damages by copper was not measured in this study to confirm this hypothesis.

Reduced glutathione is considered as a first line of cellular defence against metals by chelating and detoxifying them, scavenging oxyradicals and participating in detoxification reactions catalysed by glutathione peroxidases (Sies, 1999). The effects that we observed on this parameter, i.e. inhibition of total GSH (both reduced and oxidised GSH) without any impairment of GSSG/GSH ratio, is in line with the known ability of copper to interact with GSH forming stable GS-Cu(I) binding complexes. Besides, as proposed

by Canesi et al. (1999), it is likely an inhibitory effect on GSH regenerating systems (e.g. GSH reductase or GSH synthetase), which was not assessed in our study, that could have contributed to the observed depletion of total GSH. The fact that we did not observe any impairment of GSSG/GSH ratio by copper does not reach previous report in gilthead seabream fish exposed by copper intra peritoneal injection (Rodriguez-Ariza et al., 1994). Finally, although the mechanism by which copper inhibited GSH in fish is not fully understood and remains complex, this rapid depletion may have contributed to the early toxicity observed at the higher concentrations as suggested by Connors and Ringwood (2000).

Interestingly, biochemical responses were more rapid than copper accumulation, suggesting the involvement of differential mechanisms in copper metabolism and accumulation. Cellular copper metabolism involves copper intake by GSH and subsequent formation of GS–Cu(I) complex, from which the metal is further transferred to metallothionein apoproteins where it is stored (Freedman et al., 1989; Connors and Ringwood, 2000). The GS–Cu(I) pool is the source for the synthesis of other metalloenzymes such as SOD or cytochrome oxidase, as well as for ROS production through GS–Cu(I) oxidation (Freedman et al., 1989). In our study, antioxidant responses occurred within the first week of exposure and then recovered concomitantly with copper accumulation in the liver (Figs. 1 and 3). This indicates that at day 8, other detoxification systems, such as MTs, have been induced to replace GSH in the uptake and sequestration of copper (Freedman et al., 1989). Moreover, the role of MTs in cellular protection against oxidative stress (Viarengo et al., 2000) argues in the way that these proteins could have been involved in response to copper in three-spined stickleback. This hypothesis is strengthened by the finding that copper accumulation was accompanied by increased hepatic zinc concentrations. In fact, a significant positive correlation was observed between these two metals ( $r^2 = 0.596$ ,  $P < 0.001$ , Spearman correlation). The sequestration of metals such as cadmium and copper occurs by displacement of zinc from their binding sites, leading to a release of free zinc that could induce de novo MT synthesis (Hollis et al., 2001; Roesijadi, 1996). Relationships between liver metal content and MT expression have been described in aquatic organisms (Hollis et al., 2001) but further studies on MT response to copper in stickleback will be necessary to confirm these hypotheses for this fish species.

EROD inhibition by metals has been reported in several in vitro and in vivo studies on fish (Ghosh et al., 2001; Stien et al., 1997). In our study, we detected an inhibition of EROD activity in fish exposed to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  for 21 days (Fig. 4). This effect, which involves direct interaction of copper with the enzyme leading to a conformational change of the protein (Kim et al., 2002), may reflect cellular toxicity induced by an increased content of metal in the cell (Stien et al., 1997). Although this effect could be considered as minor regarding the responses of the other biomarkers to copper, EROD inhibition should be taken into account when using it as a

biomarker of exposure in fish exposed to a mixture of chemicals, i.e. containing both organic and metallic compounds, which mostly occurs in environmental pollution.

In summary, this dynamic study showed that waterborne copper-induced several biochemical responses in three-spined stickleback, in a transient manner, suggesting the occurrence of adaptive processes. Rapidly after the beginning of the exposure, antioxidant biomarkers were induced in order to compensate the oxidative stress generated by the metal. In a second phase, copper accumulation was correlated to a recovery of GSH and a return of antioxidant enzymes to the basal level suggesting that other detoxification mechanisms, such as MTs, have been involved to allow fish adaptation to copper. This study shows the suitability of three-spined stickleback as a model fish species to study oxidative stress biomarker responses to waterborne metal exposure. Field studies that evaluate several biomarkers, including oxidative stress biomarkers, EROD and vitellogenin, are under progress to determine the potential of stickleback as an indicator species of sublethal stress in multipollution contexts.

## Acknowledgements

We wish to thank Jean-Pierre Blanquet for the measure of physico-chemical parameters of the water and Dominique Hervin for technical assistance in fish maintenance. This work was supported by the French Budget Civil de la Recherche et du Développement (BCRD 00-102).

## References

- Andersson, P.L., Berg, A.H., Bjerselius, R., Olsén, H., Orm, P.E., Tysklind, M., 2001. Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback and arctic char after three different routes of exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 519–530.
- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 22, 61–68.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 2001. Accumulation of metals in the tissues of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 117–127.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67–76.
- Chan, P.C., Peller, O.G., Kesner, L., 1982. Copper (II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids* 17, 331–337.
- Connors, D.E., Ringwood, A.H., 2000. Effects of glutathione depletion on copper cytotoxicity in oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquat. Toxicol.* 50, 341–349.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G., 2002. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochim. Biophys. Acta* 1573, 4–8.

- Falandysz, J., Strandberg, L., Strandberg, B., Rappe, C., 1998. Polychlorinated naphthalenes in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* from the Gulf of Gdansk. *Chemosphere* 37, 2473–2487.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1998. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large french watershed. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 144–153.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598–5605.
- Ghosh, M.C., Ghosh, R., Ray, A.K., 2001. Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-o-deethylase in cultured catfish hepatocytes. *Environ. Res.* 86, 167–173.
- GRNC, 2002. Risque pour l'environnement—Évaluation des risques associés aux rejets chimiques des installations nucléaires du Nord-Cotentin. Groupe de Radioécologie du Nord Cotentin, pp. 210.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 287–303.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Handy, R.D., Runnalls, T., Russel, P.M., 2002. Histopathologic biomarkers in three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology* 11, 467–479.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C.M., 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal exposure in juvenile rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 468–474.
- Holm, G., Norrgren, L., Andersson, T., Thuren, A., 1993. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Aquat. Toxicol.* 27, 33–50.
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Mayer, I., 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1946–1954.
- Kim, J.S., Ahn, T., Yim, S.K., Yun, C.H., 2002. Differential effect of copper II on the cytochrome P450 enzymes and NADPH-cytochrome P450 reductase: inhibition of cytochrome P450-catalysed reactions by copper II ion. *Biochemistry* 41, 9438–9447.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83–104.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.* 50, 245–256.
- Ozawa, T., Ueda, J., Shimazu, Y., 1993. DNA single strand breakage by copper(II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31, 455–461.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquat. Toxicol.* 50, 109–124.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J., Lopez-Barea, J., 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98, 267–282.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Yeomans, W.E., 2002. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *J. Fish Biol.* 61, 207–229.
- Rodriguez-Ariza, A., Toribio, F., Lopez-Barea, J., 1994. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 656, 311–318.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113, 117–123.
- Roy, J., 1997. Environmental contaminants encyclopedia: copper entry. National Park Service, Water Resources Divisions, pp. 99.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916–921.
- Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Lafaurie, M., 1997. Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 214–219.
- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M., 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1607–1615.
- Svecevičius, G., Vosyliene, M.Z., 1996. Acute toxicity of copper to common freshwater fishes of Lithuania. *Ekologija* 2, 17–21.
- Turnlund, J.R., 1999. Copper. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Van der Oost, R., Beyerb, J., Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 415–421.
- Varanka, Z., Rojik, I., Varanka, I., Nemcsok, J., Abraham, M., 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol. C* 128, 467–478.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407–417.
- Yim, M., Chock, P., Stadtman, E., 1993. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J. Biol. Chem.* 268, 4099–4105.



## Article 3

Sanchez W., Piccini B., Porcher J.-M. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* (soumise).



**Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)**

WILFRIED SANCHEZ<sup>\*</sup>, BENJAMIN PICCINI and JEAN-MARC PORCHER

*Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Verneuil en Halatte, France*

\* Address correspondence to Wilfried Sanchez, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Verneuil en Halatte, France ; Phone : +33 (0)3 44 61 81 21, Fax: +33 (0)3 44 55 67 67°; E-mail : Wilfried.Sanchez@ineris.fr

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to characterise biomarker responses in three-spined sticklebacks exposed to prochloraz (Pcz). For this purpose, adult sticklebacks were exposed for 2 weeks to prochloraz at 0, 10, 50, 100 and 500 µg/L prior to one week of depuration in clean water. At days 7, 14 and 21, several hepatic biomarkers were measured including 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), total glutathione (GSH) content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Pcz induced a transient increase of antioxidant enzymes and a depletion of glutathione content during the first 8 days of exposure. This study showed that EROD activity and antioxidants were disrupted in a transient manner. GST exhibited a dose-dependent induction that was also observed after depuration and appeared as a valuable biomarker to assess the exposure to Pcz. The implications of these results for environmental biomonitoring based on biomarker measurement in stickleback are discussed.

**Keywords :** biomarkers, biotransformation enzymes, liver, oxidative stress, prochloraz, three-spined stickleback



## INTRODUCTION

Azole fungicides play a key role as antifungals and are widely used in agriculture around the world. Among these compounds, the imidazole PcZ (N-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl)imidazole-1-carboxamide) is a broad-spectrum contact fungicide employed in Europe, South America, Asia and Australia, against several diseases in wheat, barley and oleaginous plants but also for the treatment of flower production and of turf on golf courses.

As with other imidazole compounds, the action of PcZ is based on the unspecific strong interaction with the iron atom of cytochrome P450. This binding inhibits the cytochrome P450-dependent 14 $\alpha$ -demethylase activity required in the conversion of lanosterol to ergosterol, an essential component of fungal biological membranes, and disturbs the cell membrane assembly. <sup>[1]</sup>

Agricultural application of PcZ contributes to the diffuse freshwater pollution in several European countries including France and the United-Kingdom. <sup>[2,3]</sup> In several rivers of Northern France, PcZ appears as one of the most quantified pesticides and its measured concentrations in surface waters are 5-fold higher than the official standard value of 0.5  $\mu$ g of pesticides/L. <sup>[2]</sup>

In freshwater ecosystems, PcZ can generate adverse effects to aquatic organisms. Among them, fish appears as sensitive to PcZ with 96 h LC<sub>50</sub> values for rainbow trout, harlequin fish and bluegill sunfish in the range 1.5-2.9 mg/L. <sup>[4]</sup> As in fungi, PcZ modulates fish cytochrome P450 enzyme activities. PcZ is able to modulate the rainbow trout CYP1A system involved in organic pollutant detoxification process, inducing both inhibitory and induction effects on CYP1A expression and EROD activity. <sup>[5,6]</sup> A recent study reported inhibition of CYP19 aromatase activity, an enzyme involved in steroid metabolism, in the brain of male and female

fathead minnow.<sup>[7]</sup> In rainbow trout, Pcz can also modulate the phase II biotransformation enzymatic activities such as GST [5], a well known enzyme involved in protection against oxidative stress.<sup>[8]</sup>

This study was conducted to assess the biochemical responses in Pcz-exposed three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) using biotransformation enzymes (EROD and GST) and oxidative stress parameters such as GPx, CAT and GSH content, as well as TBARS content (for review, see Van der Oost et al.<sup>[9]</sup>). Pcz is a fungicide widely encountered in European freshwater ecosystem and can generate adverse effects in fish. However, to our knowledge, no study has investigated the early effect of Pcz on the biomarker responses in stickleback. This fish species has been used as a model organism to study biochemical responses to various xenobiotics such as metals<sup>[10]</sup>, pesticides<sup>[11,12]</sup>, halogenated organic compounds<sup>[13]</sup> or environmental estrogens and androgens.<sup>[14,15]</sup> More recently, stickleback has been described as a valuable sentinel fish species to assess sublethal stress in multipollution context.<sup>[16]</sup> Among the investigated parameters, EROD is a well documented biomarker in fish but its sensitivity and inducibility in stickleback are not described. Hence, the kinetic of EROD activity was first performed by using  $\beta$ -naphtoflavone (BNF) as a reference inducing compound for this enzyme.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fish Maintenance and Exposure**

Male and female adult sticklebacks were collected in uncontaminated outdoor artificial streams (INERIS, France) and maintained in experimental water (alkalinity, 367 mg.L<sup>-1</sup> as CaCO<sub>3</sub>; pH, 8.35  $\pm$  0.05) for 2 weeks prior to experimentation. The water temperature was

13.5 °C ± 1°C and the photoperiod was a light/dark cycle of 8/16 hours. Fish were fed every other day with frozen red mosquito larvae.

Fish were randomly distributed in 15 litres tanks and waterborne exposed to Pcz under semi-static conditions with complete water renewal and food supply every other day.

### **β-naphtoflavone exposure**

β-naphtoflavone (BNF) was dissolved in 5 mL of dimethyl sulphoxide (DMSO) and added to the experimental water with a maximal final concentration below 0.0001 %. Fish were exposed to 0.3, 0.9 and 2.7 µM for 12, 24, 48, 72 and 96 hours. In this experiment, one fish group was sampled before contamination. Moreover, an initial control (0 h) and a control for each exposure time was performed with and without solvent.

### **Prochloraz exposure**

Prochloraz (Pcz) was previously dissolved in 1 mL of absolute ethanol and added to the experimental tank water with a maximal solvent final concentration of 0.0001%. Fish were exposed to 10, 50, 100 and 500 µg/L (i.e. 0.03, 0.13, 0.3 and 1.3 µM) for 7 and 14 days. After 14 days, 10 fish per concentration were submitted to a depuration experiment and were maintained in uncontaminated water for 7 days with the same experimental conditions. In this experiment, an initial control (0 h) and controls for each exposure length (7, 14 days and 7 days of depuration) were performed.

### **Biochemical Analysis**

After exposure, 10 fish per concentration were randomly sampled. Fish were sacrificed, measured and weighed. Liver was dissected, weighed and homogenized in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) supplemented with 20% v/v glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a protease inhibitor. The homogenate was centrifuged at  $10,000 \times g$ , 4°C, for 15 min and the supernatant was used for biochemical assays after measurement of total protein concentration using the method developed by Bradford et al. <sup>[17]</sup>. All biochemical assays (EROD, GST, GPx, CAT, GSH and TBARS) were carried out as previously described by Sanchez et al. <sup>[10,16]</sup>

### **Statistical Analysis**

All data is reported as mean  $\pm$  standard deviation and SPSS 13.0 software was used for statistical analysis. Normal distribution and homoscedasticity of data were verified using respectively Kolmogorov-Smirnov and Levene tests. When data sets didn't have a normal distribution and/or homogeneity of variance, the biomarker data was log-transformed, using  $F(x) = \log(1+x)$ , prior to parametric analysis. Differences between biomarker responses in control of male and female fish were searched using a t-test. If a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) was observed, male and female data was treated separately. A two-way analysis of variance, using time and concentration of exposure, was performed to assess the difference of evaluated parameters for all experimental conditions. When the null hypothesis was rejected ( $\alpha=0.05$ ), the position of significant difference with the control group were tested using Sidak post hoc test ( $\alpha=0.05$ ).

### **RESULTS AND DISCUSSION**

## **Sensitivity of EROD Induction in Stickleback**

BNF exposure allows determination of a dose-response curve and completes the previous works showing the inductibility of stickleback EROD activity by chemicals in laboratory <sup>[13,18]</sup> and field experiments. <sup>[16]</sup> During this exposure no significant difference between male and female stickleback EROD activities was noticed. After 12 hours of BNF exposure, an increase of EROD activity was measured for each tested concentration. This induction was also observed for all exposure times and appeared as dose-dependent after 48, 72 and 96 hours. Maximal inductions of 7, 15 and 18 fold were observed after 72 hours (Fig.1).. The induction factors measured in the BNF exposure were similar to factors reported in fish species widely used in European field studies such as chub and gudgeon <sup>[19]</sup> but stickleback EROD appears less inducible than in rainbow trout, a fish species more widely used in laboratory for ecotoxicological studies. <sup>[20]</sup>

## **Effect of Pcz on Stickleback Biomarker Responses**

Results obtained for EROD activity are presented in Figure 2A. A transient 3- and 7-fold EROD induction was measured after 7 days of exposure to 50 and 100 µg/L respectively. A significant EROD induction was also reported after prochloraz exposure to 500 µg/L for 7 and 14 days with an induction factor of 7 and 5 fold respectively. After 7 days of depuration, no significant difference was observed between exposed and unexposed groups (Fig.2A). The present study shows that Pcz fungicide is able to induce EROD activity in three-spined stickleback. This induction appears as dose-dependent and moderate compared to the results obtained using a typical EROD inducer such as BNF. Scientific literature includes some examples of similar EROD induction generated by Pcz. Previous studies reported a transient

3-fold increase of EROD activity in rainbow trout after 7 days of 100 µg/L waterborne exposure <sup>[6]</sup> and intraperitoneal injection of Pcz. <sup>[5]</sup> To our knowledge, the mechanism of EROD induction by Pcz is unknown but several studies have investigated the structural and molecular basis of EROD induction by imidazole compounds such as clotrimazole, 1-benzylimidazole and Pcz. <sup>[21,22,23]</sup> These molecules present a non-planar conformation inconsistent with the fixation to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and an EROD induction. A possible explanation could be that the imidazoles are converted intracellularly into planar metabolites which then bind as ligands to the AhR. <sup>[23]</sup> This hypothesis is in accordance with the rapid and extensive metabolisation of the highly lipophilic Pcz fungicide ( $\log K_{ow} = 4.12$ ) to more polar metabolites as suggested by Cravedi et al. <sup>[24]</sup>. In this context, the easier excretion of polar Pcz metabolites could explain the transient response observed for EROD activity.

Results obtained for GST are presented in Figure 2B. After 7 and 14 days of Pcz exposure, GST was increased for the two higher concentrations (i.e. 100 and 500 µg/L). GST increase was also observed after 14 days of exposure to the lower concentration (i.e. 10 µg/L). After 7 days of depuration in clean water, a significant induction of GST was noticed for all tested Pcz concentrations (Fig.2B). Phase II biotransformation enzymes such as GST could play an important role in rapid and extensive metabolisation of Pcz. GST is implied in conjugation of electrophilic compounds with endogenous GSH. This reaction increases hydrophilicity of xenobiotics and thereby enhance excretion and consequently gives a detoxification effect. This hypothesis is consistent with the observed dose-dependent and persistent induction. Moreover, it is supported by previous studies investigating the effects of herbicides on stickleback hepatic enzymes that reported GST induction by various pesticides such as diquat <sup>[12]</sup> and fomesafen. <sup>[25]</sup> However, the response of GST could also be linked to Pcz-induced

oxidative stress, since this enzyme is involved in the protection against reactive oxygen species. [26]

To our knowledge, no study has investigated the induction of oxidative stress by Pcz and the present results are the first evidence of Pcz-promoted oxidative stress in fish. Results obtained for oxidative stress parameters measured after 7 days of exposure are presented in Table 1. As previously reported, GPx is a gender dependent parameter with a higher activity in female than in male stickleback [16] so, data is presented separately. Three exposed groups (i.e. 50, 100 and 500 µg/L) contained only one male fish. Hence, results are not presented and only female data is interpreted. After 7 days of exposure to 100 and 500 µg/L, female fish exhibited a transient inhibition of GPx. This phenomenon could be explained by the suicidal substrate role played by Pcz. A similar mechanism has been reported for other imidazole compounds such as clotrimazole, which is oxidised to a highly reactive free radical before inactivating peroxidase. [27] This inhibition leads to an accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and causes a decrease of GSH content and lipoperoxidation. [27]

GPx inhibition was correlated with the decrease of GSH and the increase of CAT in fish exposed to 500 µg/L (Table 1) suggesting that high Pcz concentrations promote oxidative stress. The responses of enzymatic and non-enzymatic antioxidants appeared as transient and no significant variation was observed after 14 days of exposure. Moreover, no significant variation of TBARS content was noticed (Table 1) showing that no oxidative damages occurred. This decrease of GSH could be linked to the inhibition of GPx, but also to the increase of GST activity that used reduced GSH. Besides, it is likely an inhibitory effect on GSH regenerating systems (e.g. GSH reductase and/or GSH synthetase), which was not assessed in our study, could have contributed to the observed depletion of total GSH. The fact that we did not observe lipid peroxidation generated by Pcz indicates that antioxidant systems were able to protect the cells against the injuries of reactive oxygen species. This hypothesis

was supported by the slow induction of CAT activity measured in stickleback after 7 days of exposure to 500 µg Pcz/L. CAT is involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination <sup>[28]</sup> and could eliminate the excess of this very toxic reactive oxygen species generated by GPx inhibition. Interestingly, responses of enzymatic and non-enzymatic antioxidants were rapid and transient, suggesting the implication of Pcz metabolism and elimination mechanisms involving phase two biotransformation enzymes such as GST, induced after the first week of exposure.

### **Implication for Environmental Biomonitoring**

This study provides several elements to assess exposure to Pcz and other imidazole fungicides using biochemical biomarkers in three-spined stickleback. EROD activity was characterized by a fast dose-dependent induction followed by an adaptation phenomenon. This biomarker could provide a valuable information on Pcz exposure immediately after the contamination but, if the time between contamination and sampling is increased, the Pcz exposure cannot be detected. <sup>[29]</sup> EROD activity is a well documented biomarker of exposure to dioxin-like compounds but, in the light of these results, it could not be considered as a valuable biomarker to assess the exposure to Pcz fungicide. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters exhibited the same type of response profile as for EROD activity. Moreover, antioxidant responses were only observed for the high tested concentrations. Consequently, biomarkers linked to oxidative stress could not give valuable parameters to assess the imidazole exposures. In this work, GST appears as a more promising biochemical marker of exposure to Pcz. Our results showed that this phase II biotransformation enzyme is characterized by a fast induction followed by a slow recovery. Also, GST could provide a quantitative and time-integrated estimate of levels of pollution during environmental monitoring. <sup>[29]</sup> This conclusion confirms the results of previous study indicating that GST is a



valuable biomarker of exposure to several phytopharmaceutical compounds in fish and particularly in three-spined stickleback. <sup>[12]</sup>

## **CONCLUSION**

This study showed that waterborne exposure to environmental Pcz concentrations induced Phase I and Phase II biotransformation enzymes in stickleback. EROD activity was moderately induced in a transient manner suggesting an extensive metabolism. GST exhibited a dose-dependent induction that was also observed after depuration in clean water and could be considered as a valuable biomarker to assess the exposure to this imidazole compound. For the high concentrations tested, Pcz promoted an oxidative stress characterised by depletion of GSH and perturbation of antioxidant enzyme activities. The mechanism by which Pcz promoted oxidative stress in fish is not fully understood but our results indicate that it is probably similar to the mechanism of other imidazole fungicides.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank J. Sabarly for reviewing this manuscript. This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de la Recherche et du Développement AP-2004).

## **REFERENCES**

1. Zarn, J.A.; Brüscheiler, B.J.; Schlatter, J.R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 $\alpha$ -demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111*, 255-261.
2. DIREN Ile de France "Info Phytos n°4," **2005**.
3. DEFRA " The Government's Strategic Review of diffuse water pollution from agriculture in England - Paper 1: Agriculture and water: a diffuse pollution review," **2002**.
4. Larsen, J.; Sørensen, I. The effect of esfenvalerate and prochloraz on amphibians with special reference to *Xenopus laevis* and *Bombina bombina*. *Pest. Res.* **2004**, *83*, 1-68.
5. Bach, J.; Snegaroff, J. Effects of the fungicide prochloraz on xenobiotic metabolism in rainbow trout : in vivo induction. *Xenobiotica* **1989**, *19*, 1-9.
6. Sturm, A.; Cravedi, J.P.; Perdu, E.; Baradat, M.; Segner, H. Effects of prochloraz and nonylphenol diethoxylate on hepatic biotransformation enzymes in trout: a comparative in vitro/in vivo-assessment using cultured hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *53*, 229-245.
7. Ankley, G.T.; Jensen, K.M.; Durhan, E.J.; Makynen, E.A.; Butterworth, B.C.; Kahl, M.D.; Villeneuve, D.L.; Linnam, A.; Gray, L.E.; Cardon, M.; Wilson, V.S. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* **2005**, *86*, 300-308.
8. Berhane, K.; Widersten, M.; Engstrom, A.; Kozarich, J.; Mannervik, B. Detoxication of base propenals and other  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1480-1484.
9. Van der Oost, R.; Beyerb, J.; Vermeulen, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2003**, *13*, 57-149.

10. Sanchez, W.; Palluel, O.; Meunier, L.; Coquery, M.; Porcher, J.M.; Aït-Aïssa, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *19*, 177-183.
11. Sturm, A.; Wogram, J.; Segner, H.; Liess, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, 1607-1615.
12. Sanchez, W.; Palluel, O.; Lagadic, L.; Aït-Aïssa, S.; Porcher, J.M. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar. Environ. Res.* **2006**, *62*, S29-S33.
13. Holm, G.; Norrgren, L.; Andersson, T.; Thuren, A. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquat. Toxicol.* **1993**, *27*, 33-50.
14. Katsiadaki, I.; Scott, A.P.; Hurst, M.R.; Matthiessen, P.; Mayer, I. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 1946-1954.
15. Pottinger, T.G.; Carrick, T.R.; Yeomans, W.E. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *J. Fish Biol.* **2002**, *61*, 207-229.
16. Sanchez, W.; Aït-Aïssa, S.; Palluel, O.; Ditché, J.M.; Porcher, J.M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* **2007**, *16*, 279-287.
17. Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

18. Holm, G.; Lundström, J.; Andersson, T.; Norrgren, L. Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* **1994**, *29*, 241-256.
19. Flammarion, P.; Fortier, V.; Migeon, B.; Morfin, P.; Garric, J. Cytochrome P450 1A induction in gudgeon *Gobio gobio* : laboratory and field studies. *Biomarkers* **1999**, *4*, 59-71.
20. Haasch, M.L.; Quardokus, E.M.; Sutherland, L.A.; Goodrich, M.S.; Prince, R.; Cooper, K.R.; Lech, J.J. CYP1A1 protein and mRNA in teleosts as an environmental bioindicator: laboratory and environmental studies. *Mar. Environ. Res.* **1992**, *34*, 139-145.
21. Navas, J.M.; Chana, A.; Herradon, B.; Segner, H. Induction of CYP1A by the N-imidazole derivative, 1-benzylimidazole. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 830-836.
22. Navas, J.M.; Chana, A.; Herradon, B.; Segner, H. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci.* **2004**, *76*, 699-714.
- (23) Babin, M.; Casado, S.; Chana, A.; Herradon, B.; Segner, H.; Tarazona, J.V.; Navas, J.M. Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicol. in Vitro* **2005**, *19*, 899-902.
- (24) Cravedi, J.P.; Boudry, G.; Baradat, M.; Rao, D.; Debrauwer, L. Metabolic fate of 2,4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative in vivo/in vitro approach. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *53*, 159-172.
- (25) Sanchez, W., Palluel, O., Cravedi, J.P., Lagadic, L., Porcher, J.M. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant and adjuvant-herbicide mixtures on three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.), Proceeding of 13th international symposium Pollutant Responses in Marine Organisms, Alessandria, Italy, **2005**, 93.

- (26) Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine; 3 ed.; Oxford University Press, **1999**.
- (27) Trivedi, V.; Chand, P.; Srivastava, K.; Puri, S.K.; Maulik, P.R.; Bandyopadhyay, U. Clotrimazole inhibits hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and induces oxidative stress: proposed antimalarial mechanism of clotrimazole. J. Biol. Chem. **2005**, *280*, 41129-41136.
- (28) Matés, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology **2000**, *153*, 83-104.
- (29) Wu, R.S.S.; Siu, W.H.L.; Shin, P.K.S. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. Mar. Poll. Bull. **2005**, *51*, 623-634.

## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1.** Effect of 96 hours  $\beta$ -naphtoflavone treatment on hepatic EROD activity. Data represent mean  $\pm$  SD of the measurements on ten fish per group. (\*) statistically different from control ( $P < 0.05$ ).

**Figure 2.** Effect of prochloraz 21 days treatment on biotransformation enzyme activities : EROD (A) and GST (B). Data represent mean  $\pm$  SD of the measurements on ten fish per group. (\*) statistically different from control ( $P < 0.05$ ).

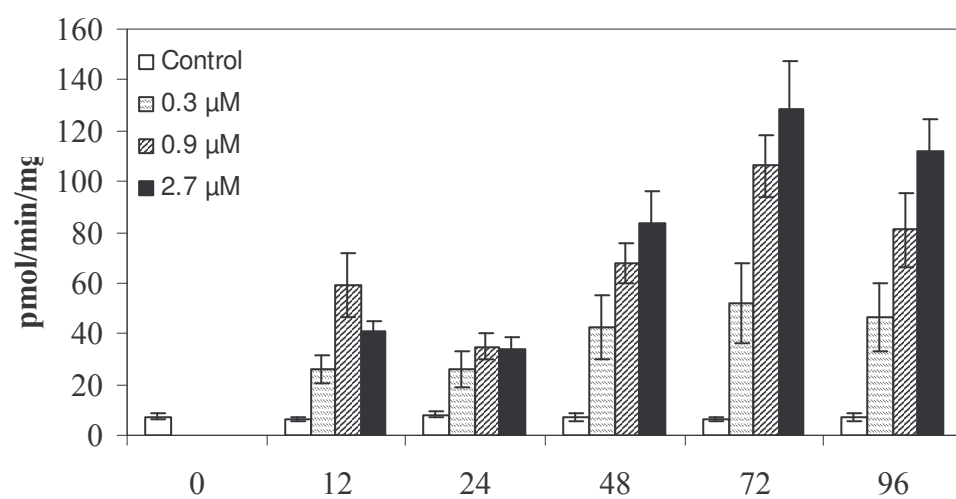


Fig. 1

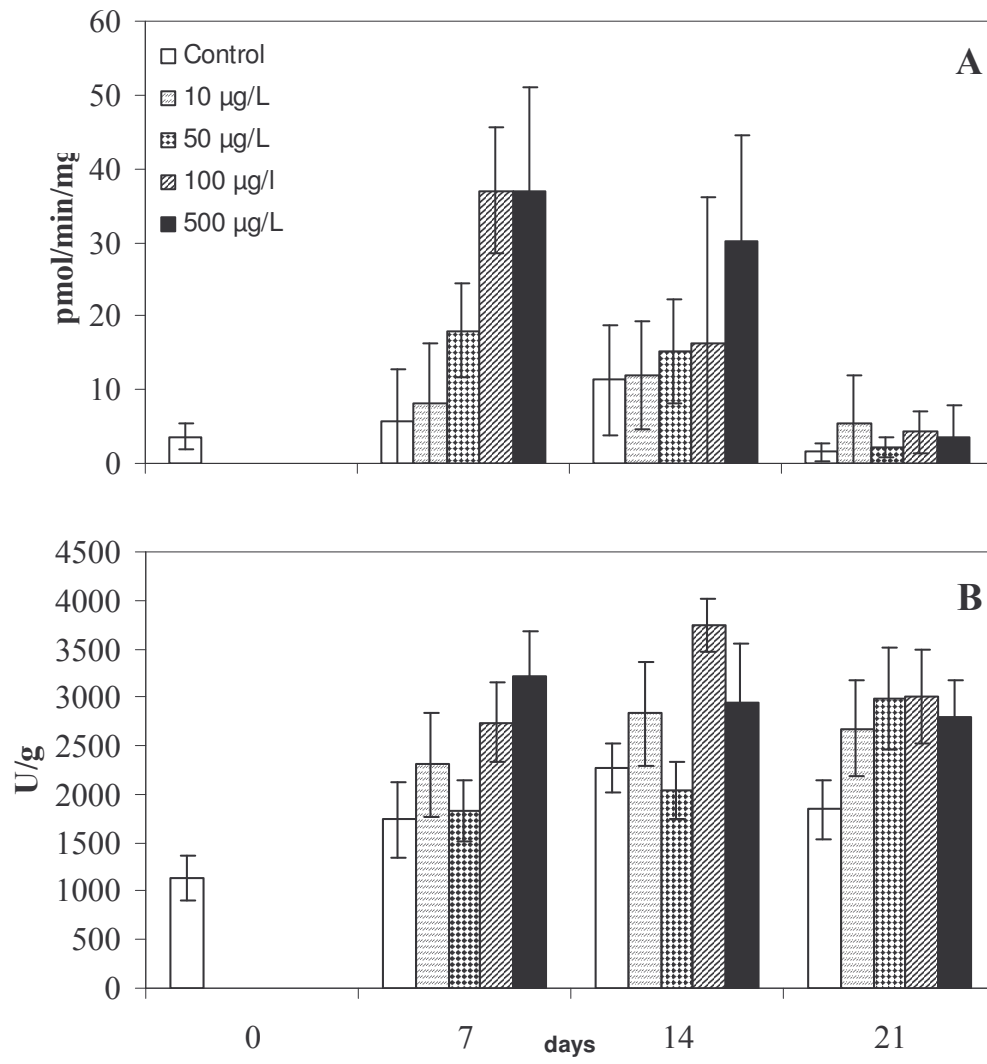


Fig. 2



Table 1. Effect of 7 days prochloraz treatment on hepatic antioxidant parameters and TBARS content. Data represents mean  $\pm$  SD of the measurements on ten fish per group except for GPx where males and females have been separated. The fish number is indicated between brackets. (\*) statistically different from control ( $P < 0.05$ ).

	Control	Prochloraz ( $\mu\text{g/L}$ )			
		10	50	100	500
Male GPx (U/g prot.)	51 $\pm$ 4 (3)	63 $\pm$ 6 (2)	(1)	(1)	(1)
Female GPx (U/g prot.)	152 $\pm$ 57 (7)	138 $\pm$ 53 (8)	128 $\pm$ 33 (9)	84 $\pm$ 32* (9)	83 $\pm$ 26* (9)
CAT (U/g prot.)	253 $\pm$ 82	374 $\pm$ 108	205 $\pm$ 98	412 $\pm$ 115	565 $\pm$ 80*
GSH ( $\mu\text{mol/g prot.}$ )	7.6 $\pm$ 4.1	5.2 $\pm$ 1.8	3.5 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 2.0*	1.2 $\pm$ 1.0*
TBARS (nmol/g prot.)	16.1 $\pm$ 7.5	15.4 $\pm$ 10.2	16.1 $\pm$ 5.5	22.1 $\pm$ 21.1	20.6 $\pm$ 15.3



## Article 4

Sanchez W., Palluel O., Lagadic L., Aït-Aïssa S., Porcher J.-M. (2006). Biochemical effects of nonyphenol polyethoxylate adjuvant, diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Marine Environmental Research*, **62**, S29-S33.



Short communication

# Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)

W. Sanchez <sup>a,\*</sup>, O. Palluel <sup>a</sup>, L. Lagadic <sup>b</sup>, S. Aït-Aïssa <sup>a</sup>,  
J.-M. Porcher <sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Institute of Industrial Environment and Risk (INERIS), Ecotoxicological Risk Assessment Unit,  
BP 2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

<sup>b</sup> National Institute of Agronomic Research (INRA), Ecotoxicology and Quality of Aquatic Environments,  
65 rue de Saint Brieuc, CS 84215, F-35440 Rennes cedex, France

---

## Abstract

This study examined the response of 7-ethoxyresorufine-*O*-deethylase, glutathione-*S*-transferase, glutathione peroxidase, glutathione content, level of thiobarbituric acid reactive compounds and circulating vitellogenin, in three-spined sticklebacks after 21 days of exposure to Diquat herbicide, commercial nonylphenol polyethoxylate adjuvant and mixture between Diquat and adjuvant. The results showed that adjuvant exerted more important oxidative effects than Diquat and that mixture effects were unlike to single additivity. This study argues for ecotoxicological risk assessment of adjuvants and mixtures of adjuvants and pesticides.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Nonylphenol polyethoxylate; Herbicide; Oxidative stress; Biotransformation enzymes; Vitellogenin; Three-spined stickleback

---

To increase agricultural treatment efficiency, pesticides are frequently used in combination with adjuvants to improve foliar coverage and leaf absorption. Recently, Xie et al. (2005) showed greater than additive effects on vitellogenin synthesis between pesticides

---

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 44 55 69 42; fax: +33 3 44 55 67 67.  
E-mail address: [wilfried.sanchez-Etudiant@ineris.fr](mailto:wilfried.sanchez-Etudiant@ineris.fr) (W. Sanchez).

and NPEO adjuvant. However, there is still much to be done to understand the underlying mechanisms in the case of mixtures. This study was performed to examine biochemical biomarker responses to NPEO-containing adjuvant and its combination with an herbicide, in three-spined stickleback.

The adjuvant is Agral90<sup>®</sup>, a commercial non-ionic surfactant including NPEO and widely employed as a tank-mix adjuvant. Nonylphenol and mono- and diethoxylated derivatives are recognized as weak estrogenic endocrine disruptors in aquatic organisms (Schwaiger et al., 2002) but little is known about the effects of other ethoxylated derivatives of nonylphenol on aquatic wildlife. The associated herbicide is Diquat dibromide (6,7-dihydrodipyrido[1,2-a:2',1'-c]pyrazinediium), a quaternary ammonium herbicide employed for potatoes and bean weeding and as aquatic herbicide in many countries. The action of Diquat is based on the reactive oxygen species production that can also impair biological molecules of aquatic organisms.

According to the known mode of action of Diquat, we studied biomarkers that were related to both oxidative stress (GPx, GSH and TBARS) and oxidative metabolism of xenobiotics (EROD and GST) in the liver. In addition, because degradation products of NPEO are recognised as weak estrogenic, we also measured plasmatic vitellogenin as an indicator of estrogenic response.

Male and female adult sticklebacks were maintained two weeks at  $13 \pm 0.5$  °C under 8/16 (Light/Dark) photoperiod. Ten fish per condition were waterborne exposed, in semi-static conditions with complete water renewal and food supply every other day, (1) to environmental (22 and 44 µg/L) and sublethal (222 and 444 µg/L) Diquat concentrations, (2) to Agral90 alone at 50, 100, 500 and 1000 µg/L according to the 1:2.25 ratio (Diquat:Agral90<sup>®</sup>) advised by the supplier, and (3) to Diquat/Agral90 combinations at concentrations of 22:50, 44:100, 222:500 and 444:1000 µg/L, respectively. After 21 days, livers were dissected and homogenized in phosphate buffer supplemented with glycerol and protease inhibitor. The post-mitochondrial fraction was used for biochemical assays according to methods described by Sanchez et al. (2005a). Male fish blood (0–5 fish per concentration) was sampled in phosphate buffer supplemented with protease inhibitor and vitellogenin was quantified using a competitive ELISA (Sanchez et al., 2005b).

In this study, Diquat alone had no effect on hepatic oxidative stress biomarkers (Fig. 1) although it has been described as a redox cycling chemical. Nevertheless, it was able to alter biotransformation enzymes by inhibiting basal EROD activity and inducing GST (Fig. 1) in accordance with Gallagher et al. (1995) that showed an inhibition of EROD and mRNA-CYP1A production in rat in vitro and in vivo experiments. The effect on GST could be explained by its ability to protect against reactive oxygen species and its implication in oxidative metabolism of several pesticides (Halliwell and Gutteridge, 1999) as supported by the negative correlation between EROD and GST (Fig. 2).

Agral90<sup>®</sup> appeared as a strong oxidative agent as shown by induction of GPx and TBARS and depletion of total hepatic GSH pool (Fig. 1). These results are in accordance with the capacity of alkylphenols to alter redox status in Atlantic cod (Hasselberg et al., 2004) and could reflect the biological membrane degradation by reactive oxygen species and the degradation product elimination by antioxidant parameters. In addition, Agral90<sup>®</sup> inhibited almost totally basal EROD activity at low doses (Fig. 1). The hypothesis that this effect is related to the known capacity of nonylphenol to exert anti-CYP1A effect through its binding to the estrogen receptor (Arukwe et al., 1997) is unlikely since no effect on vitellogenin level in male fish was observed (Fig. 1). The length of NPEO alkyl

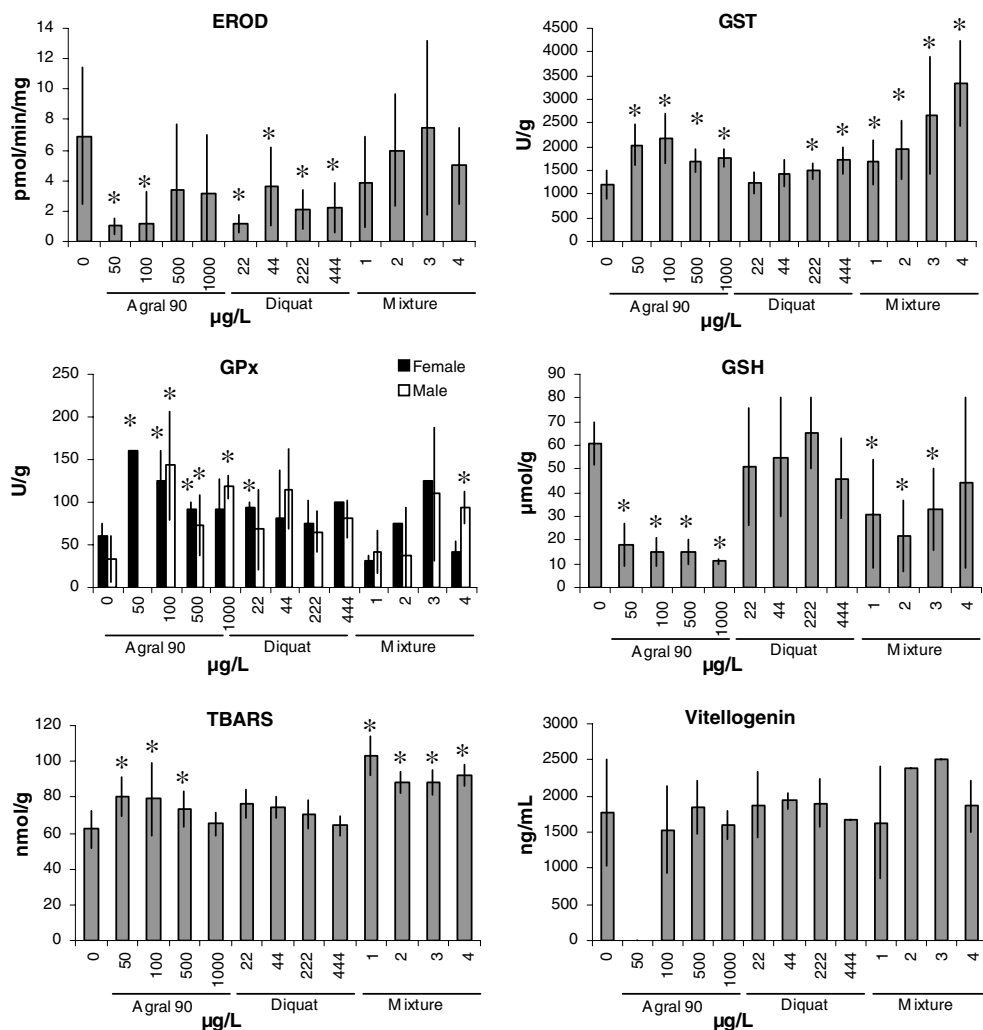


Fig. 1. Biomarker responses after 21 days of exposure to Agral90®, Diquat and their mixture. Data are presented as mean ± SD. *T*-test was performed to evaluate gender differences and data were presented separately when a significant difference was noticed (GPx). Comparison with control group were performed using two-way ANOVA followed by Sidak test. \* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ). Numbers 1–4 refer to the increasing concentrations of mixture.

group could explain the lack of vtg induction as reported by *in vitro* experiments (Routledge and Sumpter, 1997). However, the weak number of male fish per group could also explain the lack of effect. Besides, EROD inhibition may rather reflect direct inhibition enzyme through either oxidative mechanism and/or membrane alteration as indicated by TBARS induction. Few data are available for NPEO effects in fish and further investigations should be done to determine the exact mechanism of NPEO adjuvants. The GST induction after NPEO exposure (Fig. 1) could be explained by the phenol group of NPEO making it directly available to GST (Ankley and Agosin, 1987). Moreover, GST could

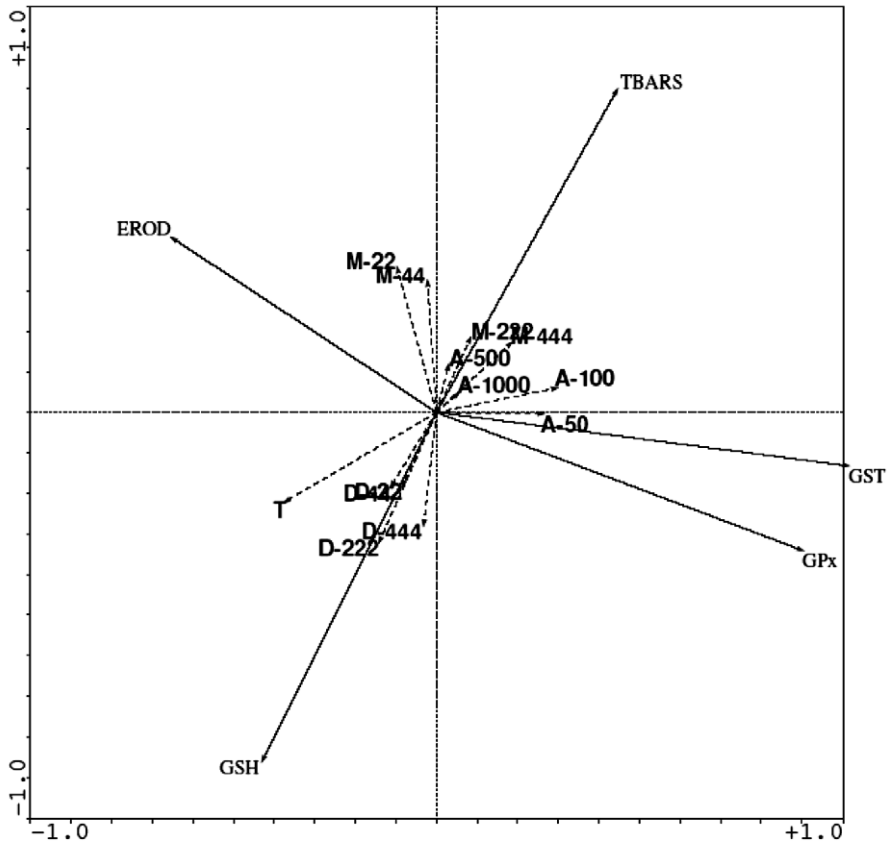


Fig. 2. Principal component analysis performed with centred and normalized hepatic biomarkers data. Exposure conditions are presented as letter-number code (D = Diquat, A = Agral90, M = mixture and T = control. The number indicates the tested concentration).

have been induced by lipid peroxidation products as indicated by correlation between GST and GPx (Fig. 2).

Interestingly, co-exposure to the mix Diquat-Agral90<sup>®</sup> nullified the inhibitory effects of both compounds on EROD, which could suggest that they inhibit this enzyme through distinct and antagonistic mechanisms. Conversely, the mixture led to a GST induction stronger than substances alone, suggesting a synergistic interaction. Overall, these results suggest that Diquat and Agral90<sup>®</sup> had some interactive effects on oxidative metabolism capacity. Such possible interaction may have few consequences on oxidative stress parameters, although the mixture induced TBARS at higher levels than with Agral90<sup>®</sup> alone.

Using the three-spined stickleback, this study shows that environmental concentrations of NPEO adjuvant generate oxidative stress and affects biotransformation enzymes in fish. Moreover, Agral90<sup>®</sup> modulates herbicide adverse effects by increasing GST activity and lipoperoxidation. These results show that the adjuvant can exhibit more important effects



than the active substance and argue for ecotoxicological risk assessment of adjuvants and tank-mixes between these adjuvants and pesticides.

## Acknowledgement

This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development through the Programme *Evaluation and Reduction of Risks due to the Use of Pesticides*.

## References

- Ankley, G.T., Agosin, M., 1987. Comparative Biochemistry and Physiology B 87, 671–673.
- Arukwe, A., Forlin, L., Goksoyr, A., 1997. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 2576–2583.
- Gallagher, E.P., Buetler, T.M., Stapleton, P.L., Wang, C.H., Stahl, D.L., Eaton, D.L., 1995. Toxicology and Applied Pharmacology 134, 81–91.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.
- Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., 2004. Aquatic Toxicology 69, 95–105.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1997. Journal of Biological Chemistry 272, 3280–3288.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., Ait-Aïssa, S., 2005a. Environmental Toxicology and Pharmacology 19, 177–183.
- Sanchez, W., Brion, F., Nilsen, B.M., Porcher, J.-M. (2005b). In: Proceedings of the 15th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Lille, France.
- Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H., Knoerr, S., Braunbeck, T., Kalbfus, W., Negele, R.D., 2002. Aquatic Toxicology 59, 177–189.
- Xie, L., Thripleton, K., Irwin, M.A., Siemering, G.S., Mekebri, A., Crane, D., Berry, K., Schlenk, D., 2005. Toxicological Sciences 87, 391–398.



## Article 5

Sanchez W., Aït-Aïssa S, Ditché J.-M., Palluel O., Porcher J.-M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology*, **16**, 279-287.



# Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams

Wilfried Sanchez · Sélim Aït-Aïssa ·  
Olivier Palluel · Jean-Maxence Ditché ·  
Jean-Marc Porcher

Accepted: 22 November 2006 / Published online: 26 January 2007  
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

**Abstract** Recently, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) has been proposed as a suitable fish species for detecting both androgen- and estrogen-induced endocrine disruption by environmental pollutants. This relatively pollution-tolerant fish is present in most European streams and small rivers but also coastal and estuarine areas. The purpose of the present field study was to determine the extent to which multiple biomarkers in this fish species could distinguish between streams with different pollution levels. Sticklebacks were sampled in French rivers characterised by various urban, industrial or agricultural contaminations and in outdoor lotic mesocosms as reference site. Physiological parameters including condition factor and liver somatic index, biotransformation enzymes such as 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and glutathione-*S*-transferase, antioxidant enzymes including glutathione peroxidase and total glutathione (GSH) content and lipoperoxidation (as TBARS) showed several differences between sites. For example, fish from an heavily contaminated stream exhibited a 9-fold EROD induction associated to a decrease of GSH and a 3-fold increase of TBARS content in comparison to fish from uncontaminated sites. When fish were transferred from polluted river to clean water, some of these

biomarkers rapidly returned to basal levels found in fish in the reference site while others, like TBARS levels were still high after 2 weeks of depuration. Based on multivariate analyses, the battery of biomarkers proved to differentiate all sites, with a very good classification rate for highly contaminated streams. Influence of fish gender and sampling period on biomarker responses was also observed and is discussed. The results of this field study provide additional support for the use of stickleback for in situ multi-biomarker assessment.

**Keywords** Three-spined stickleback · Biomarkers · Oxidative stress · Field study · Depuration experiment

## Introduction

Biomarkers have been proposed as sensitive tools for detecting environmental exposure and adverse effects of toxic anthropogenic chemicals on aquatic organisms. Biomarkers have been defined as a change in biological response which can be related to exposure or toxic effect of environmental chemicals (Peakall 1994). In recent years, the usefulness of a set of biomarkers has been demonstrated in environmental biomonitoring in several aquatic species, including freshwater fish (Galloway et al. 2004; Triebskorn et al. 2001). In European rivers, the fish species mostly employed to assess biological effects of contaminants using a set of biomarkers are chub and roach (Flammarion et al. 2002). However, due to the fish species diversity encountered in streams and estuaries, the assessment of various other species for biomarker-based biomonitoring is still needed.

W. Sanchez (✉) · S. Aït-Aïssa · O. Palluel ·  
J.-M. Porcher  
Unité d'Évaluation des Risques Ecotoxicologiques, Institut  
National de l'Environnement Industriel et des Risques  
(INERIS), BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France  
e-mail: Wilfried.Sanchez@ineris.fr

J.-M. Ditché  
Conseil Supérieur de la Pêche, DR N°1,3 rue Sainte-Marie,  
60200 Compiègne, France

The three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) appears to be a promising species to assess the impact of contaminants in aquatic biota in that it is relatively tolerant to environmental pollution, and that it inhabits most streams, small rivers, estuarine and coastal areas in Europe (Wootton 1984). Moreover, this fish species is a well-studied model for biologists since behaviour, ecology and evolution of stickleback have been extensively characterised. The responses of several biochemical parameters such as vitellogenin (Pottinger et al. 2002), spiggin (Katsiadaki et al. 2002) and 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (Holm et al. 1993) have been investigated in laboratory studies and have appeared as promising biomarkers of chemical exposure to be used in environmental biomonitoring. Despite its relative ubiquity, to our knowledge, cholinesterase activity and liver histopathology are the only biomarkers investigated and validated in the stickleback (Handy et al. 2002; Sturm et al. 2000) and, therefore efforts are still needed to validate other biochemical biomarker responses in situ for the monitoring of fish health in freshwater ecosystems.

In previous studies, we examined a set of hepatic biotransformation and oxidative stress endpoints as potential biomarkers for various pollutants in stickleback (Sanchez et al. 2005, 2006). The purpose of the study was to validate these biomarkers in the field when this fish species are exposed to a variety of pollutants in rivers situated in Northern France. Biomarker responses in wild sticklebacks sampled in five sites subjected to different types and levels of contamination (Table 1) were examined. The studied biomarkers were related to xenobiotic metabolism (i.e. 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase [EROD] and glutathione-*S*-transferase [GST]) and to oxidative stress (i.e.

glutathione peroxidase [GPx], total glutathione content [GSH] and lipoperoxidation [TBARS]), as well as to physiological parameters (i.e. liver somatic index [HSI] and condition factor [CF]). Moreover, a first evaluation of biomarker reversibility in stickleback from one of the most contaminated streams was performed to investigate the evolution of biomarker profiles over a 15 day depuration period in clean water.

## Materials and methods

### Sampling design

During 2003 and 2004, five sites located in the North of France characterised by the presence of wild stickleback population and exhibiting various qualitative and quantitative contaminations were investigated. Table 1 summarises some general characteristics of the selected sites and fish sampling in each site. All sampling of adult sticklebacks were carried out by electrofishing in Spring (between June and July) and/or Autumn (September–October). All sampling sites have been impacted by urban and/or agricultural activities as determined by the Fish Based-Index (FBI) quality score based on occurrence and abundance data and reflecting the level of degradation of fish assemblage structure (Oberdorff et al. 2002). Therefore they could not be considered true reference sites so, reference fish were sampled at equivalent sampling periods in uncontaminated outdoor lotic mesocosms located at INERIS (Verneuil en Halatte, France). Each mesocosm channel was 20 m long, 1 m wide with a water depth of 0.3 m in the upper section and 0.7 m in the lower section. The mesocosms were initially set-up

**Table 1** Summary of some general characteristics of the five selected sites

	Réveillon (REV)	Ourcq (OUR)	Lézarde (LEZ)	Rhonelle (RHO)	Escaut (ESC)
GPS coordinates	N 48°43'00" E 2°32'09"	N 49°11'42" E 3°31'32"	N 49°34'09" E 0°13'20"	N 50°17'49" E 3°32'41"	N 53°23'40" E 3°32'56"
Strahler's rank <sup>a</sup>	2	3	1	2	4
Pressure <sup>b</sup>	Urban dense	Intensive agriculture	Mixed	Urban dense	Urban dense
Water quality <sup>c</sup>	–	Medium	Good	Bad	Bad
Fish based index <sup>d</sup>	5	4	3	3	3
Sampling period	Spring 2003 Spring 2004	Spring 2003	Autumn 2004	Autumn 2004	Autumn 2004

<sup>a</sup> Strahler's rank based on structure and density of hydrographic network (Strahler 1957)

<sup>b</sup> Data obtained from the Eurowaterne database of European Environment Agency (EEA 2001)

<sup>c</sup> Data obtained from the "Seine-Normandie" water agency for OUR and LEZ and from "Artois-Picardie" water agency for RHO and ESC

<sup>d</sup> Fish based-index quality score based on occurrence and abundance data and reflecting the level of degradation of fish assemblage structure (Oberdorff et al. 2002). FBI score ranged from 1 (no disturbance) to 5 (very high disturbance)

with natural and artificial sediments, aquatic plants, phytoplankton, periphyton, benthic and pelagic invertebrates, microorganisms and one fish species that is the stickleback. The channels were fed by denitrated water from a drinking water treatment plant with a flow of 800 l/h by channel.

### Depuration experiment

To determine the potential reversibility of biomarkers when fish are returned to clean water, we collected 45 fish from the Réveillon (REV) river in Spring 2003 campaign and transferred them to the laboratory in aerated tanks. The fish were divided into three groups of 15 and placed in denitrated water (alkalinity, 367 mg/l as  $\text{CaCO}_3$ ; pH,  $8.35 \pm 0.05$ ) for periods of 4, 8 and 15 days. This experiment was carried out in semi-static conditions with complete water renewal and food supply every 2 days. The water temperature was  $14 \pm 0.5^\circ\text{C}$  and the photoperiod corresponded to natural light/dark cycle at this period.

### Sample preparation

Fish were measured, weighed and sacrificed immediately after being caught. The CF was calculated according to Pottinger et al. (2002), while HSI was calculated as  $(\text{liver weight/fish weight}) \times 100$ . Livers were removed, weighed and frozen in liquid nitrogen prior to homogenisation and biochemical analysis. The homogenisation was in 200  $\mu\text{l}$  of ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride using a Potter-Elvehjem homogeniser. The homogenates were centrifuged at 10,000g,  $4^\circ\text{C}$ , for 15 min and the post-mitochondrial fractions were used for biochemical assays. Total protein concentrations were determined using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard (Bradford 1976).

### Biochemical biomarker assays

EROD, GST, GPx and GSH assays were conducted, respectively, according to the methods of Flammarion et al. (1998), Habig et al. (1974), Paglia and Valentine (1967) and Vandeputte et al. (1994). These assays were adapted in microplates and optimised for stickleback to fit the linearity of each assay. The total protein concentrations used for each assay were 0.5–10 g/l for EROD and 0.5, 5 and 4 g/l for GST, GPx and GSH, respectively. Lipid peroxidation was estimated by adding 345  $\mu\text{l}$  of TBARS reagent (Ohkawa et al. 1979) to 60  $\mu\text{l}$  of a 3 g proteins/l diluted samples.

Samples were then heated and TBARS were quantified by fluorimetric measurement with 515 nm wavelength excitation and 553 nm wavelength emission. Malonaldehyde (MDA) was used as standard, and results were expressed in nmol of MDA equivalent/g of proteins.

### Statistical analysis

All data are reported as mean  $\pm$  standard deviation and SPSS 13.0 software was used for statistical analysis. First, normal distribution and homoscedasticity of data were verified using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. Since data sets had not a normal distribution and/or homogeneity of variance, the biomarker data was log-transformed, using  $F(x) = \log(1 + x)$ , prior to parametric analysis. Second, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed for each biomarker using sites and gender as factors. When sites by gender interaction was significant ( $\alpha = 0.05$ ), male and female data were treated separately. Biomarker responses measured at each sampling period in uncontaminated mesocosms, were compared using one-way ANOVA followed by Sidak test ( $\alpha = 0.05$ ). To determine the differences between biomarker responses observed in contaminated sites and mesocosms, a *t*-test was performed ( $\alpha = 0.05$ ). A standardised Principal Component Analysis (PCA) was performed to investigate relationships between investigated variables. A step by step discriminant analysis (DA) using discriminating functions and followed by cross validation was carried out to classify the sites.

## Results

The results for physiological and biochemical parameters are presented in Tables 2, 3. In these tables, males and females are presented separately when significant differences were revealed by two-way ANOVA performed using site and gender as co-factors for each parameters (Table 4).

### Influence of gender and sampling period on biomarker levels

Several biotic and abiotic factors are known to affect the biomarker responses. Our results showed that CF, HSI, phase I and phase II biotransformation enzymes, GPx activity and GSH were gender dependent parameters, while TBARS was not (Table 4). No significant interaction was noticed between biomarkers and fish weight or length (data not shown).

**Table 2** Morphological parameters for three-spined sticklebacks sampled in contaminated sites and uncontaminated mesocosms

Sampling period	Sites	Gender	Fish number	Fish length (mm)	Fish weight (g)	CF	HSI (%)
Spring 2003	MESO	♂	11	43 ± 3 <sup>A</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>A</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>A</sup>	2.3 ± 1.8 <sup>A</sup>
		♀	19	44 ± 4 <sup>A</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>A</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>A</sup>	3.3 ± 1.1 <sup>A</sup>
	REV	♂	14	54 ± 3*	1.6 ± 0.3*	1.0 ± 0.1	4.1 ± 1.3*
		♀	15	54 ± 4*	1.6 ± 0.4*	1.0 ± 0.1	6.1 ± 0.9*
	OUR	♂	9	54 ± 3*	1.7 ± 0.3*	1.0 ± 0.1	3.1 ± 0.7
Spring 2004	MESO	♂	4	55 ± 4*	1.9 ± 0.2*	1.2 ± 0.1*	7.2 ± 1.2*
		♀	10	50 ± 7 <sup>B</sup>	4.3 ± 0.5 <sup>AB</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>A</sup>	1.7 ± 0.6 <sup>A</sup>
	REV	♂	15	59 ± 6 <sup>B</sup>	2.0 ± 0.7 <sup>B</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>A</sup>	2.5 ± 0.7 <sup>A</sup>
		♀	15	57 ± 4*	2.0 ± 0.4*	1.0 ± 0.09	3.5 ± 0.7*
	MESO	♂	15	58 ± 4	2.4 ± 0.6	1.2 ± 0.1*	8.2 ± 1.0*
Autumn 2004	MESO	♂	15	53 ± 4 <sup>B</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>B</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.4 ± 0.8 <sup>A</sup>
		♀	15	52 ± 7 <sup>C</sup>	1.3 ± 0.7 <sup>A</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.7 ± 0.4 <sup>A</sup>
	LEZ	♂	10	39 ± 3*	0.6 ± 0.1*	1.0 ± 0.08	2.4 ± 0.6
		♀	18	39 ± 1*	0.6 ± 0.1*	0.9 ± 0.06	2.4 ± 0.7
	RHO	♂	13	59 ± 3*	2.1 ± 0.4*	1.0 ± 0.09	3.0 ± 0.8
		♀	17	59 ± 5*	2.1 ± 0.5*	1.0 ± 0.08*	5.0 ± 1.1*
	ESC	♂	19	51 ± 3	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.06	4.1 ± 1.4*
		♀	8	50 ± 4	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.07	3.3 ± 0.6*

Data are presented as mean ± SD. \* Indicates a significant difference compared to mesocosm group sampled at the same period ( $p < 0.05$ ). Mesocosm groups annotated with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

**Table 3** Biomarker responses for three-spined sticklebacks sampled in contaminated sites and uncontaminated mesocosms

Sampling period	Sites	Gender	Fish number	EROD (pmol/min/mg)	GST (U/g)	GPx (U/g)	GSH (μmol/g)	TBARS (nmol/g)
Spring 2003	MESO	♂	11	23.9 ± 19.8 <sup>A</sup>	1273 ± 406 <sup>A</sup>	57 ± 14 <sup>A</sup>	41.6 ± 25.0 <sup>A</sup>	46 ± 25 <sup>A</sup>
		♀	19	32.1 ± 27.2 <sup>A</sup>	1233 ± 417 <sup>A</sup>	113 ± 57 <sup>A</sup>	23.9 ± 18.4 <sup>A</sup>	
	REV	♂	14	34.1 ± 15.7	2131 ± 538*	88 ± 29*	18.1 ± 1.3*	148 ± 41*
		♀	15	20.3 ± 9.6	1304 ± 881	583 ± 211*	20.4 ± 5.9	
	OUR	♂	9	7.9 ± 3.9*	1458 ± 539	60 ± 25	23.5 ± 6.0*	92 ± 21*
Spring 2004	MESO	♀	4	9.7 ± 4.7*	688 ± 147*	809 ± 72*	18.4 ± 1.8	
		♂	14	4.9 ± 1.8 <sup>B</sup>	1259 ± 522 <sup>A</sup>	74 ± 47 <sup>A</sup>	59.7 ± 6.5 <sup>A</sup>	53 ± 29 <sup>A</sup>
	REV	♀	10	8.4 ± 4.3 <sup>B</sup>	1486 ± 779 <sup>A</sup>	134 ± 116 <sup>A</sup>	82.7 ± 74.6 <sup>B</sup>	
		♂	15	43.3 ± 35.9*	1063 ± 514	72 ± 46	42.8 ± 19.7*	164 ± 46*
	MESO	♀	15	22.7 ± 33.8	1195 ± 1226	72 ± 57	47.8 ± 17.3	
Autumn 2004	MESO	♂	15	4.5 ± 2.1 <sup>B</sup>	1843 ± 419 <sup>B</sup>	119 ± 113 <sup>A</sup>	36.1 ± 15.5 <sup>A</sup>	55 ± 17 <sup>A</sup>
		♀	15	5.0 ± 4.0 <sup>B</sup>	2105 ± 479 <sup>B</sup>	134 ± 53 <sup>A</sup>	46.5 ± 18.9 <sup>B</sup>	
	LEZ	♂	10	4.6 ± 3.6	1572 ± 385	160 ± 68	42.2 ± 10.1	48 ± 14
		♀	18	2.6 ± 1.7*	1151 ± 362*	118 ± 69	41.8 ± 21.2	
	RHO	♂	13	3.2 ± 1.4	3638 ± 601*	440 ± 136*	13.6 ± 3.3*	203 ± 33*
		♀	17	4.1 ± 3.6	3457 ± 636*	564 ± 127*	14.0 ± 4.8*	
	ESC	♂	19	22.5 ± 5.7*	2778 ± 675*	84 ± 37	24.6 ± 7.0	127 ± 25*
		♀	8	27.6 ± 7.7*	2782 ± 190*	136 ± 40	25.4 ± 5.1*	

Data are presented as mean ± SD. \* Indicates a significant difference compared to mesocosm group sampled at the same period ( $p < 0.05$ ). Mesocosm groups annotated with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

In uncontaminated mesocosms, morphological indexes, GPx and TBARS exhibited no significant difference between fish sampled in Spring and in Autumn (Tables 2, 3). In mesocosms, unexpected and relatively high EROD activity was observed in fish sampled during Spring 2003. This measure could be considered as an artefact and is unlikely to be representative of unaffected basal level since comparison to EROD levels in several laboratory controls are generally 5–10 pmol/

min/mg (Holm et al. 1993; Sanchez et al. 2005). No other significant differences were noticed for EROD activity measured in mesocosm fish at different sampling periods (Table 3). An increase of GST was measured in mesocosm fish sampled in Autumn compared to those sampled in the Spring. Moreover, variations of GSH content were also noticed, with a weaker GSH content in those fish sampled in Spring of 2003 compared to fish in Spring 2004 (Table 3).



**Table 4** Results of two-way ANOVA performed for physiological parameters and biochemical biomarkers in three-spined stickleback sampled in all study sites

Biomarkers	Sites ( <i>p</i> )	Gender ( <i>p</i> )	Interaction ( <i>p</i> )
Fish length	<0.001*	<0.001*	0.143
Fish weight	<0.001*	<0.001*	0.084
CF	<0.001*	0.337	0.039*
HSI	<0.001*	<0.001*	<0.001*
EROD	<0.001*	0.364	0.037*
GST	<0.001*	0.024*	0.015*
GPx	<0.001*	<0.001*	<0.001*
GSH	<0.001*	0.756	0.009*
TBARS	<0.001*	0.549	0.355

\* Indicates that null hypothesis is not assumed ( $p < 0.05$ )

### In situ biomarker responses

Some morphological index variations were observed between fish from mesocosms and contaminated sites (Table 2). CF was increased in female fish sampled in sites OUR, RHO and REV during Spring 2004. HSI was increased in all sites except in LEZ and in male fish from OUR and RHO.

EROD was induced in fish from ESC and in male fish from REV during Spring 2004. A high EROD value was also observed in REV during spring 2003, which corroborates the 2004 results, and indicates that fish were likely to have been exposed to dioxin-like compounds at these sites. A decrease of the EROD activity was measured in female fish from LEZ (Table 3). Glutathione S-transferase was induced both in males and females from RHO, ESC, and in male fish from REV during Spring 2003, but was inhibited in female fish from OUR and LEZ (Table 3).

The assessment of oxidative stress biomarkers showed that antioxidant defences were clearly affected in the sites characterised by moderate or high contamination (i.e. REV, OUR, RHO and ESC) as compared to the low contaminated site LEZ or mesocosms. Depletion of GSH together with increased TBARS levels (up to 4-fold the reference level) showed that pollution-exposed fish were subjected to oxidative stress. Alteration of redox liver status in REV (only in 2003), OUR and RHO, was further confirmed by strong induction of GPx, which is involved in organic and hydro-peroxide degradation.

### Multi-variate analysis

To explore overall relationships between the different variables, we ran a PCA from a matrix data that included biomarkers, morphological and general indexes as variables. The Fig. 1A shows that 58% of

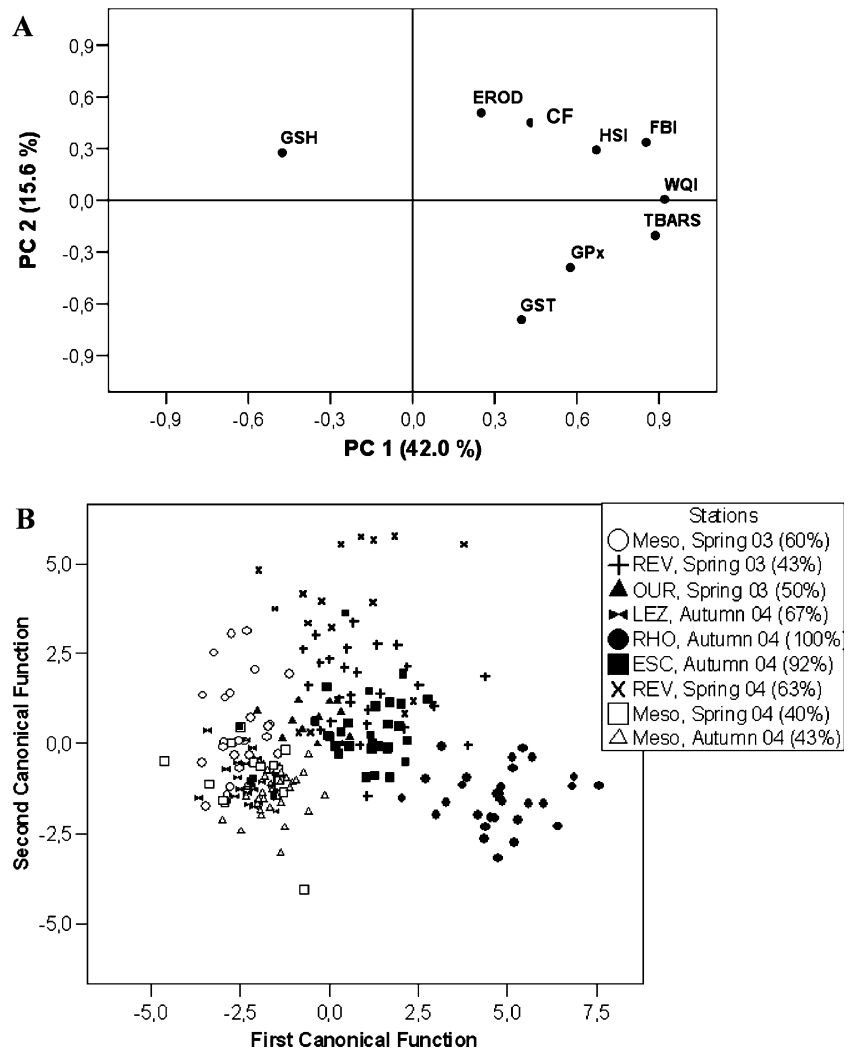
overall variance is explained by the first two principal components. The first principal component (PC1, 42% of variance) was mainly built by the water quality index (WQI) and TBARS that were found to be strongly correlated ( $r = 0.8$ ,  $p = 0.001$ , Pearson's coefficient). On this axis, fish from mesocosms and LEZ were clearly distinguished from fish sampled in other sites (not illustrated). The PC2 (16% of overall variance) was mainly formed by GST and EROD. As expected, this axis distinguished fish from RHO, which had high GST levels, to fish from REV 2004 that had high EROD levels (not illustrated). Moreover, on the first factorial plan of the PCA, different correlation between biomarkers were suggested and further confirmed by Pearson's correlation test: negative correlation between GSH and other oxidative stress parameters: GST ( $r = -0.238$ ,  $p < 0.001$ ), GPx ( $r = -0.292$ ,  $p < 0.001$ ) and TBARS ( $r = -0.312$ ,  $p < 0.001$ ), and positive correlation between TBARS and enzymatic antioxidants (GST:  $r = 0.429$ ,  $p < 0.001$  and GPx:  $r = 0.517$ ,  $p < 0.001$ ).

We then used step by step DA to further examine the discriminating power of the set of biomarkers. This analysis showed that, while all investigated biomarkers participated significantly to the discrimination, some weighted more heavily than others in site discrimination: TBARS > GST > EROD > GSH > GPx > HSI > CF. As shown in Fig. 1B, DA revealed a very good discrimination of the contaminated sites RHO and ESC with, respectively, 100 and 92% of successful classification rates. The lower rates of successful classification in the contaminated sites REV and OUR were due to the misclassification of some fish in ESC, another impacted site. Likewise, the lower rate in the lesser contaminated site LEZ, were due to badly classified fish in mesocosm groups as they presented low biomarker variations as compared to this group. To overcome variations linked to the sampling period, DA were also performed within each sampling period. Overall, the results confirmed a very good discrimination characterised by successful classification rates, i.e. higher than 75% for all sites except for the LEZ river where 30% of fish were badly classified in mesocosm group (data not shown).

### Depuration experiment

In REV, fish exhibited altered levels of all investigated biomarkers as compared to basal levels in mesocosms (Tables 2, 3). The depuration experiment (Table 5) demonstrated that to varying degrees, some of the biomarker responses were reversed when fish were moved into clean water for 15 days. CF and HSI

**Fig. 1** Multivariate analysis carried out all data including the nine sites as samples and seven biomarkers as variables. **(A)** Representation of the biomarkers and the environmental variables (WQI and FBI) in the first factorial plane of the PCA. **(B)** Discriminant analysis (DA) presenting the stream separation based on biomarker responses. For each location, the rate of successful classification is presented in brackets



slightly decreased by 10–30% in clean water, reaching the level observed in male fish from mesocosms. This was also observed with in situ induction of EROD and GST which were completely reversed after 15 day depuration. In contrast, only slight recoveries were noted for TBARS (decreased by 26%) and GSH (increased by 34% in males), while GPx induction was still present after 15 days. Overall, these results confirmed that, in REV, fish had undergone relatively high oxidative damage in the liver that was still persistent after 2 weeks.

## Discussion

The aim of our research on three-spined stickleback was to determine the potential of this small fish species as a sentinel organism for in situ monitoring of aquatic contaminants. To our knowledge, this study is the first

one that has explored the responses of a set of biomarkers in sticklebacks sampled in various contamination contexts. We showed that individual biomarkers such as morphological indexes (CF and HSI), biotransformation enzymes (EROD and GST) and oxidative stress parameters (GPx, GSH and TBARS) were altered in fish sampled in streams impacted by various contaminants and their combination allowed site discrimination.

The need of multi-biomarker approach for freshwater biomonitoring has been largely reported by several previous field studies (Galloway et al. 2004; Triebskorn et al. 2001). In our work, a noteworthy fact was that the set of selected biomarkers was able to discriminate the different sites accordingly to general indexes based on water quality and fish assemblage. Moreover, the biomarker approach enabled to distinguish between two sites that were similarly classified by general indexes. For instance, in the heavily contaminated

**Table 5** Biomarker responses in fish from REV maintained 15 days in clean water

		Days of depuration			
		0	4	8	15
Fish number	♂	14	9	12	12
	♀	15	6	3	3
CF	♂	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.09*	0.9 ± 0.07*
	♀	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.07*	0.9 ± 0.03*
HSI	♂	4.1 ± 1.3	2.8 ± 0.6*	2.6 ± 0.5*	2.7 ± 0.9*
	♀	6.1 ± 0.9	4.9 ± 0.9*	3.9 ± 0.05*	4.8 ± 0.5*
EROD	♂	34.1 ± 15.7	14.2 ± 9.3*	23.4 ± 20.9	5.5 ± 4.3*
	♀	20.3 ± 9.6	8.3 ± 5.4*	4.4 ± 2.5*	4.1 ± 4.9*
GST	♂	2131 ± 538	1818 ± 637	1393 ± 412*	1250 ± 461*
	♀	1304 ± 881	1246 ± 518	1461 ± 635	1284 ± 502
GPx	♂	88 ± 29	98 ± 28	37.2 ± 18.0*	68 ± 88
	♀	583 ± 211	533 ± 294	689 <sup>a</sup>	588 ± 104
GSH	♂	18.1 ± 1.3	23.2 ± 5.1*	19.1 ± 11.2	24.2 ± 6.0*
	♀	20.4 ± 5.9	17.5 ± 5.5	24 ± 13.7	17.8 ± 0.8
TBARS		148 ± 41	147 ± 37	127 ± 29	109 ± 21*

The unit of each biomarker is indicated in the Tables 3, 4. Data are presented as mean ± SD. \* Indicates a significant difference compared to  $t_0$  control group ( $p < 0.05$ )

<sup>a</sup> Indicates  $n = 1$

streams RHO and ESC, biomarker response patterns were different with a strong oxidative stress in RHO compared to ESC where fish exhibited high EROD levels. These differences may probably reflect variation in the nature of chemical contaminants to which the fish were exposed. However, other sites such as OUR and REV were less discriminated than the other impacted sites, e.g. some REV fish were classified in ESC group in the DA. This may reflect a limit in the selected combination of biomarkers and the addition of other specific biomarkers could be a practical way to improve the discriminating power of the battery. Nonetheless, the multivariate analyses showed that the number of investigated biomarkers cannot be reduced without losing discriminating power. This showed that all biomarkers significantly contribute within the battery, although with different weighting.

The biomarker response patterns in stickleback suggested that fish inhabiting in polluted areas may have undergone sublethal stress, possibly due to exposure to different chemical contaminants, although chemical analyses in fish could not be performed in this study. EROD activity is a documented biomarker in stickleback and previous laboratory studies investigated its response in this fish species after exposure to polyhalogenated compounds (Holm et al. 1993), pesticides (Sanchez et al. 2006) and metals (Sanchez et al. 2005). In the present study, both basal levels in uncontaminated sites and EROD induction measured in REV and ESC were consistent with the known range of variations for this biomarker in stickleback. The 5-fold observed induction could be considered as moderate as compared to the 20-fold induction reported by Holm et al. (1993) and probably revealed exposure of fish to aryl hydrocarbon receptor agonists in these sites.

As for EROD, baseline levels of antioxidants and oxidative damages measured in poorly impacted sites were in accordance with the levels previously reported for stickleback (Sanchez et al. 2005, 2006). Moreover, both the nature and the extent of oxidative stress biomarker responses observed in fish from contaminated streams (REV, OUR, RHO and ESC) were also in line with the range of variation reported after laboratory exposure to metals (Sanchez et al. 2005) and agricultural technical mixtures (Sanchez et al. 2006). An exception occurred from GPx that was characterised in situ by a strong induction (from 5 to 10-fold as compared to mesocosm fish), which had not been previously observed in laboratory experiments using model oxidative chemicals.

CF and HSI are general indicators of fish health widely used for population assessments because they integrate many levels of sub-organismal processes and are easily measured. Overall, only minor effects were observed on these parameters as illustrated by their low weight in site discrimination as compared to biochemical parameters in the DA. In stickleback, baseline data are available for comparison (Pottinger et al. 2002; Sokolowska et al. 2004) and show that only HSI of fish from heavily contaminated sites (REV and ESC) is out of the normal range of variation. This result could reflect a liver enlargement in fish exposed to environmental chemicals which corroborated findings from other biochemical biomarkers in these sites.

Biomarker responses of stickleback appear as a potential relevant tool to assess water quality. The depuration experiment provided valuable information on their reversibility in clean water and their limits for monitoring application. It demonstrated that to varying degrees, biomarker responses were generally

reversed when fish were transferred into clean water. Based on this experiment, EROD and GST were characterised by a fast recovery. However, these parameters cannot reflect the time integration of contamination effects, they can only reflect a recent pollution episode. In this context, a frequent sampling could be requested in order to not underestimate pollution (Wu et al. 2005). Conversely, oxidative stress biomarkers such as GPx and TBARS, appeared as parameters characterised by a slow recovery and could be considered as robust biochemical parameters providing a time-integrated estimate of pollution levels. A less frequent sampling is also required to evaluate the effects of water quality on oxidative stress parameters (Wu et al. 2005).

The present work suggested that stickleback biomarker responses were influenced by natural variability. Various biotic factors such as age, gender, feeding behaviour, and environmental factors including diet availability, water temperature, dissolved oxygen level and parasites can enhance or decrease the biotransformation activities (Whyte et al. 2000), antioxidant defences (Martinez-Alvarez et al. 2005) and fish health reflected by HSI and CF (Pottinger et al. 2002; Sokolowska et al. 2004). These confounding factors could also prevent using biomarker application for routine monitoring. Hence, it is necessary to characterise natural variability of biomarker responses. This field study provides a first indication on certain confounding factors that could influence the selected biomarkers in stickleback. Except for TBARS, all investigated indicators appeared to be gender-dependent. This effect could be explained by the important variation in physiology and biochemistry of female fish during the reproductive phase as previously described for HSI (Sokolowska et al. 2004) and EROD activity (Flammarion et al. 1998). For instance, some biomarkers such as GST exhibited a seasonal variability with higher levels in Autumn than in Spring. This could be linked to its implication in the hepatic degradation of sex steroids and the variation of hormone levels after the breeding period (Gallagher et al. 2001). Interestingly, GPx induction were strongly gender-dependent in OUR and REV sampled in Spring. Similar trends were observed in mesocosms at the same period. To our knowledge, such gender-effect on this enzyme has not been previously reported in fish. In addition, other factors linked to seasonal variability such as predation, parasite infestation and food availability could also be the source of the variation of biomarkers in uncontaminated stickleback (Martinez-Alvarez et al. 2005). As an

example, Pascual et al. (2003) showed that susceptibility to oxidative stress in fish, as determined by oxidative stress biomarkers contents, is enhanced by food deprivation. These consideration argue for a better characterisation of stickleback biomarker's natural variability due to biotic and abiotic factors prior to their routine application for freshwater biomonitoring.

## Conclusion

This study was designed to assess the usefulness of physiological and biochemical biomarkers in sticklebacks sampled from low and highly impacted areas. The response profiles of investigated biomarkers allowed a good discrimination between highly contaminated streams and moderately polluted or unpolluted sites. Other aspects related to using sticklebacks as a sentinel species were highlighted during this study. The abundance and distribution of stickleback within the study area facilitated sampling of several sites located in reference and polluted areas, however in large rivers, this could be limited by the availability of specific habitats. Moreover, stickleback is characterised by a stationary behaviour, hence the observed responses could reflect the local environment. This field study demonstrates the potential of stickleback as a sentinel fish species to assess sublethal stress in multipollution context. Further studies are in progress to include other specific biomarkers such as vitellogenin, spiggin and cholinesterase in this set of biochemical parameters. In addition, seasonal variability together with chemical analysis of the water will be studied more thoroughly on selected sites in order to better characterise the influence of natural and chemical factors on biomarker responses in this fish species.

**Acknowledgements** We thank the official fishguards from the Conseil Supérieur de la Pêche and S. Lamothe for his technical assistance in fish sampling. We thank also Prof R. Coulombe (Utah State University) and J. Sabarly for reviewing this manuscript. This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de la Recherche et du Développement AP-2004).

## References

- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- EEA (2001) Reporting river quality using the water quality accounts methodology. Application within the Eurowater-net process, Copenhagen, p 24

- Flammarion P, Migeon B, Garric J (1998) Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large french watershed. *Ecotoxicol Environ Saf* 40:144–153
- Flammarion P, Devaux A, Nehls S, Migeon B, Noury P, Garric J (2002) Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicol Environ Saf* 51:145–153
- Gallagher EP, Gross TS, Sheehy KM (2001) Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat Toxicol* 55:223–237
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH (2004) A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sci Technol* 38:1723–1731
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Handy RD, Runnalls T, Russel PM (2002) Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology* 11:467–479
- Holm G, Norrgren L, Andersson T, Thuren A (1993) Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquat Toxicol* 27:33–50
- Katsiadaki I, Scott AP, Hurst MR, Matthiessen P, Mayer I (2002) Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem* 21:1946–1954
- Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A (2005) Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisher* 15:75–88
- Oberdorff T, Pont D, Hugueny B, Belliard J, Berrebi D, Thomas R, Porcher JP (2002) Adaptation et validation d'un indice poisson (FBI) pour l'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau français. *Bull Fr Pêche Piscic* 365/366:405–433
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169
- Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, Lopez-Barea J, Peinado J (2003) Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem-Biol Interact* 145:191–199
- Peakall DW (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News* 1:55–60
- Pottinger TG, Carrick TR, Yeomans WE (2002) The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *J Fish Biol* 61:207–229
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:177–183
- Sanchez W, Palluel O, Lagadic L, Aït-Aïssa S, Porcher JM (2006) Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar Environ Res* 62:S29–S33
- Sokolowska E, Kalamar H, Kulczykowska E (2004) Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comp Biochem Physiol – Part A* 139:365–369
- Strahler AN (1957) Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Trans Am Geophys Union* 38:913–920
- Sturm A, Wogram J, Segner H, Liess M (2000) Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ Toxicol Chem* 19:1607–1615
- Triebkorn R, Böhmer J, Braunbeck T, Honnen W, Köhler HR, Lehmann R, Oberemm A, Schwaiger J, Segner H, Schüürmann G, Traunspurger W (2001) The project VALIMAR (VALidation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *J Aquat Ecosyst Stress Recov* 8:161–178
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 10:415–421
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30:347–570
- Wootton RJ (1984) A functional biology of sticklebacks. Croom Helm, London Sidney, p 265
- Wu RSS, Siu WHL, Shin PKS (2005) Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Mar Poll Bull* 51:623–634



## Article 6

Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Multi-biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environmental Pollution* (en préparation)





**Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)  
as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach**

Wilfried Sanchez<sup>1\*</sup>, Ioanna Katsiadaki<sup>2</sup>, Benjamin Piccini<sup>1</sup>, Jean-Maxence Ditché<sup>3</sup> and  
Jean-Marc Porcher<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité  
d'Evaluation des Risques Ecotoxicologiques, BP2, 60550, Verneuil-en-Halatte, France

<sup>2</sup> Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (Cefas), Barrack Road,  
The Nothe, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, United Kingdom

<sup>3</sup> Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques, 60200 Compiègne, France

\* Corresponding author. Tel : +33 (0)3 44 61 81 21 ; Fax: +33 (0)3 44 55 67 67

E-mail address : Wilfried.Sanchez@ineris.fr (W. Sanchez)

## **Abstract**

The biochemical response of wild sticklebacks collected in Autumn 2005 at seven stations in the North of France was studied using a set of complementary biomarkers. Here we provide information on biotransformation of xenobiotics, oxidative stress exposure and damages, neurotoxicity and endocrine disruption are provided. All the sites are characterized by a specific response pattern that allows distinguishing sampling locations. Moreover, these responses are in accordance with data on existing environmental pressures and the chemical analysis of metals performed in surface water. The assessment of individual responses is completed by fish population disturbance monitoring. Based on these measurements, the investigated sites are characterized by different levels of disturbance. This study argues for a multi-parametric approach of aquatic ecosystem contamination based on association between chemical, biochemical and ecological endpoints and provides a testimony of the usefulness of stickleback for this purpose.

Key-words : three-spined stickleback ; biomarkers ; fish ; biotransformation enzymes ; oxidative stress ; neurotoxicity ; endocrine disruption, field study

## 1. Introduction

Water quality of aquatic ecosystems is assessed using a combination of chemical and ecological methods. Chemical monitoring is based on quantification of pollutant groups in water, sediments and biota. This targeted approach provides a valuable information on media contamination by a limited number of chemicals but it is not integrative since the effects of contamination on aquatic organisms are not considered (Amiard et al., 1998).

Ecological monitoring is based on community structure assessment in various taxonomic assemblages including diatoms (Prygiel, 2002), oligochaetes (Prygiel et al., 1999) and fish (Oberdorff et al., 2002). These methods allow to detect adverse ecological effects but they respond to various disturbances acting at the community level and they are no reliable indicators of ecological impairment caused by specific contaminants (Amiard et al., 1998).

To assess the effects of contamination at low organisation levels, several studies have focused on biomarker utilisation as indicators of chemical exposure and early responses of aquatic organisms. Biomarkers are defined as observable or measurable modifications at the molecular, biochemical, cellular, physiological or behavioural levels revealing the exposure of an organism to xenobiotics (Lagadic et al., 1997). To evaluate the various responses to pollutant mixtures in organisms, the usefulness of a set of complementary biomarkers has been demonstrated and is now applied in environmental biomonitoring programs (Flammarion et al., 2002b; Schmitt et al., 2005; Triebskorn et al., 2001).

In this study, we have selected the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as sentinel fish species. This is a small size fish widely distributed in European waters including fresh, estuarine and coastal waters, and characterised by a relatively sedentary

behaviour. The stickleback is a well-studied model for biologists since their behaviour, ecology and evolution have been extensively characterised. Moreover, this is the only species with a quantifiable androgen and anti-androgen biomarker : the spiggin (Katsiadaki et al., 2002a). This androgen-induced glue protein is synthesised by the kidney (Jakobsson et al., 1999). In environmental toxicology, stickleback is also considered as a valuable model species that enable the measurement of both biochemical and physiological responses to pollutants such as metals (Sanchez et al., 2005), pesticides (Katsiadaki et al., 2006; Sanchez et al., 2006; Wogram et al., 2001), halogenated organic compounds (Holm et al., 1994) and steroids (Pottinger et al., 2002; Sebire et al., 2007). Stickleback biomarker responses can also be used for the biomonitoring of freshwater ecosystem contamination as previously described for cholinesterase activities (Sturm et al., 2000) and liver histology (Handy et al., 2002). More recently, we have demonstrated the potential of using the stickleback as a sentinel fish species to assess sublethal stress in multipollution context using a set of biochemical biomarkers (Sanchez et al., 2007).

The present study was designed to evaluate the use of a battery of biomarkers in stickleback as an early warning system for aquatic contamination. For this purpose, we used a set of parameters including biochemical biomarkers and biometrical measurements to characterise the various contaminated study sites. The investigated endpoints were selected in order to represent several biological processes. These included xenobiotic biotransformation activities such as 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST), and neurotoxicity of pollutants with acetylcholine esterase (AChE) activity in the muscle. Antioxidants such as glutathione peroxidase (GPx), total glutathione content (GSH) and oxidative damages with

thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were also studied. Vitellogenin (VTG) and spiggin (SPG) concentrations in males and females respectively were measured to evaluate exposure to endocrine disrupter compounds. Physiological parameters such as liver and gonad somatic index (HSI and GSI respectively) and condition factor (CF) were also determined. The biomarker measurements were complemented with (1) assessment of water quality of sampled sites based on physico-chemical characterisation and metal quantification; and (2) analysis of fish assemblage disturbances.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Site descriptions**

Fish were collected from 7 sites (Table 1) located in the North of France and characterised by the presence of wild stickleback populations. To reduce variations due to geographical factors, sampling sites were selected within the same hydro-ecoregion (Wasson et al., 2002). These sites were selected in order to assess the effects of various qualitative and quantitative impacts on stickleback biochemical responses as well as on fish population and community assemblages. Three sampling sites including Lézarde River (LEZ), Vallon du Vivier (VDV) and Val des Fontaines (VDF) were considered as having a low level of contamination by anthropogenic activities. The other four sites were considered as heavily contaminated by different activities. Among them, the stations located in the Réveillon River (REV) and the Rhonelle River (RHO) were selected because of their position within an urbanised and cultivated area. The Vilpion River station (VIL) was chosen because of its position within an intensive agricultural area, and the Escaut River station (ESC) because of its location within an heavily industrialised and urbanised area.

Table 1

Since sticklebacks are able to inhabit in various hydrosystems, all investigated stations were characterised by position according to Huet's (1949) zonation and Strahler's (1957) rank determination (Table 1). Moreover, water temperature, pH, dissolved oxygen concentration, conductivity and hardness were measured prior to fish sampling.

## **2.2. Metal analysis in water**

In the beginning of the study Firstly, all water samples were analysed by ICP/AES (Inductively Coupled Plasma /Atomic Emission Spectrometry) according to the standard NF EN ISO 11885. These analyses were carried out in a semi-quantitative way (screening). A total of 33 inorganic elements were studied over a 0 – 10 mg/L concentration range. The limit of quantification, for all of them, was equal to 50 µg/L. Subsequently to these results, the same samples were analysed by ICP/MS (Inductively Coupled Plasma / Mass Spectrometry) according to the standard NF EN ISO 17294. Samples were filtered (porosity 0.45 µm) prior to the analysis. Cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn) were analysed quantitatively on the dissolved fraction. The concentration range was between 0 and 50 µg/L. The limit of quantification was equal to 1 µg/L except for Cd that was equal to 0.09 µg/L.

## **2.3. Fish collection and tissue sampling**

Three-spined sticklebacks were collected during autumn 2005 by electrofishing according to the standards "Sampling of fish with electricity" (EN 14011). The station of REV, LEZ, RHO, VIL and VDV were sampled by total prospecting with recall. For ESC and VDF, a number of sub-samples proportional to the diversity of the habitats present and representative in terms of richness, specific composition and abundance was sampled. Fish ranging from 35 to 60 mm in length were selected to measure biochemical parameters. A quota of 30 fish was chosen except at VDV and VDF where only 24 fish

were sampled. After capture, the fish were weighed, measured and immediately sacrificed. Blood was collected, diluted 4-fold in phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) and stored in liquid nitrogen prior VTG analysis. Liver, gonad, kidney and muscle were rapidly dissected, weighed and frozen in liquid nitrogen prior to homogenisation and biochemical analysis.

For all fish, the condition factor (CF) was calculated according to Pottinger et al. (2002), while somatic indexes for liver and gonad (HSI and GSI respectively) were calculated as (organ weight / fish weight) x 100.

#### **2.4. Biochemical analysis**

Livers were homogenised in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The homogenates were centrifuged at 10,000 g, 4°C, for 15 min and the postmitochondrial fractions were used for biochemical assays. Total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard. Hepatic biomarker assays including EROD, GST, GPx, GSH and TBARS were conducted, respectively, according to the methods of Flammarion et al. (1998a), Habig et al. (1974), Paglia and Valentine (1967), Vandeputte et al. (1994) and Ohkawa et al. (1979) adapted in microplate and optimised for stickleback as previously described (Sanchez et al., 2007).

As in the liver, all muscle samples were homogenised, centrifuged to obtain the post-mitochondrial fraction and total protein concentrations were determined. AChE activity was measured in muscle according the method developed by Sturm et al. (2000).

Butyryl-cholinesterase was inhibited using tetraisopropyl pyrophosphoramidate and the formation of 5-thio-2-nitro-benzoic acid generated by the sample diluted at 0.5 g of

proteins/L or standard of AChE from electric eel (Sigma-Aldrich Chemicals) was monitored at 405 nm. The results were expressed as nmol/min/mg of proteins.

VTG concentration was measured in total blood according the method of Sanchez et al (2005). This assay is based on a competition for the anti-VTG antibodies (GA-306, Biosense Laboratories, Bergen, Norway) diluted to 1:1,000 between standard-VTG coated on the wells of a microtiter plate at 25 ng/mL and free VTG in the sample or standard solutions.

Spiggin was quantified in kidney. For this, 200  $\mu$ L of a strong denaturing buffer [100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 8 M urea, 2% SDS (w/v), and 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol; pH 8.5] were added to kidney and samples were heated at 70°C for 30 min. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure for spiggin has been described in detail elsewhere (Katsiadaki et al., 2002b). This assay is based on a competition for the anti-spiggin antibodies between protein derived from nests coated on the wells of a microtiter plate and free spiggin in the sample. Spiggin contents were expressed as units/kidney.

## **2.5. Fish community assessment**

Disturbances of fish assemblage were assessed according to a Fish-Based Index (FBI) adapted to French ichthyofauna (Oberdorff et al., 2002). Several aspects of fish species composition, richness and abundance were evaluated through seven metrics including, number of total fish species, number of rheophile fish species, and number of litophile fish species, density of tolerant individuals, density of invertivore individuals, density of omnivore individuals and total density of fish assemblage. Environmental factors of sampling location such as sampling and watershed area, altitude, position in longitudinal gradient, were also included in the multimetric index calculation. The



quality ratings were established as followed : High < 7; Good, ]7-16]; Moderate, ]16-25]; Poor, ]25-36]; Bad, > 36 whilst 16 represented the optimal cut-off level for assemblage impairment.

## **2.6. Statistical analysis**

The condition factor, somatic index and biomarker data are reported as mean  $\pm$  standard deviation and the SPSS 14.0 software was used for statistical analysis. Firstly, normal distribution and homoscedasticity of data were verified using Kolmogorov-Smirnov and Levene tests respectively. Since data sets did not have a normal distribution and/or homogeneity of variance, the data was log-transformed, using  $F(x) = \log(1+x)$ , prior to parametric analysis. Secondly, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed for each parameter using sites and gender as factors. When sites by gender interaction was significant ( $\alpha=0.05$ ), male and female data were treated separately. To determine the differences between biomarker responses measured in sampled sites, a one-way ANOVA followed by Sidak test ( $\alpha=0.05$ ) was performed.

## **3. Results**

### **3.1. Water quality**

Physicochemical data were interpreted according to the rules for Water Quality Index determination. These analyses did not provide an exhaustive view of water contamination but they did give some information on the water quality. Table 2 shows physicochemical parameters recorded in each sampled sites. The pH was stable and around neutral at all locations. The water at REV, ESC and RHO, three sites characterised by urban dense pressure, exhibited an high conductivity. Among these sites, REV was also characterised by a low dissolved oxygen concentration and an high temperature, results that point out the heavy contamination levels of this stream.

Table 2

Table 3 presents the metal concentrations measured in the studied sites. In LEZ, VDV and VDF surface water, no high metal concentration was detected. Conversely, all other streams were contaminated by several metals. High phosphorus concentrations were measured at REV, RHO, and ESC. Moreover, REV exhibited high copper and zinc concentrations and RHO was characterised by a heavily cadmium contamination. In ESC surface water, elevated concentrations of various metals such as aluminium, copper, iron, lead and zinc, were noticed. The site of VIL was characterised by high concentration of copper and rubidium.

Table 3

### 3.2. Biochemical biomarkers

Results of biomarker measurements are presented in table 4. Biomarker responses did not appear as gender-dependent except for GPx that was characterised by a mean activity in females significantly more elevated than in males ( $p<0.05$ ). The responses observed in various sampling locations were compared to data recorded at VDV that can be considered as an uncontaminated site.

Table 4

Fish from REV and ESC exhibited an EROD activity of  $30.06\pm 21.0$  pmol/min/mg and  $31.3\pm 17.6$  pmol/min/mg respectively that appeared as clearly elevated ( $p<0.05$ ) compared to VDV ( $7.2\pm 6.3$  pmol/min/mg). An increasing trend was also noticed in fish from LEZ and VDF. A decrease of EROD activity was noticed in fish from VIL that exhibited an EROD activity of  $2.1\pm 3.2$  pmol/min/mg. GST activity measured in fish from REV (i.e.  $3197\pm 890$  U/g) appeared as strongly induced ( $p<0.05$ ) compared to all other sampling sites. Conversely, fish collected at VDV exhibited a significantly low value of  $1024\pm 167$  U/g ( $p<0.05$ ) compared to other locations where GST activity ranged from  $1386\pm 256$  U/g to  $1662\pm 278$  U/g.

The measurement of oxidative stress biomarkers showed that antioxidant defences were disturbed in fish from the most contaminated sites. GPx activity was strongly induced in both male and female fish from RHO and VIL ( $p < 0.05$ ). Fish from RHO and ESC were also characterised by a significant depletion of GSH with levels of  $10.9 \pm 7.7 \mu\text{mol/g}$  and  $7.0 \pm 4.8 \mu\text{mol/g}$  respectively. Conversely, GSH concentration was significantly increased in REV's fish ( $40.2 \pm 16.0 \mu\text{mol/g}$ ;  $p < 0.05$ ). Disturbances of antioxidant defences were associated to oxidative damage as lipoperoxidation in stickleback collected at REV, ESC and RHO that showed a TBARS concentrations significantly increased compared to VDV ( $p < 0.05$ ).

AChE activity was clearly affected in various investigated stations. This enzyme was inhibited in fish sampled at REV, ESC, RHO and VIL with values ranged from  $67 \pm 11 \text{ nmol/min/mg}$  to  $32 \pm 9 \text{ nmol/min/mg}$  but only sticklebacks from REV and VIL exhibited an inhibition factor below 50%. Conversely, fish collected at VDF showed a weakly induction of AChE activity with a value of  $102 \pm 18 \text{ nmol/min/mg}$ . In this study, AChE activity was length-dependent ( $\text{AChE} = -82.748 \ln(\text{length}) + 379.57$ ;  $R^2 = 0.2166$ ;  $p < 0.05$ ). However, after data normalisation by fish length according the method described by Flammarion et al. (2002a), no significant difference between original and normalised data was noticed and, the effect of fish length has been ignored (data not shown).

The assessment of endocrine disruption biomarkers showed that fish from various sampling locations were probably exposed to estrogenic and/or androgenic compounds. Male sticklebacks from REV exhibited an induced VTG with a concentration of  $21.8 \pm 17.2 \mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ). VTG was also significantly induced ( $p < 0.05$ ) in male fish collected at ESC and RHO with concentrations of  $213.4 \pm 212.7 \mu\text{g/mL}$  and  $70.3 \pm 39.1$

µg/mL respectively. In these two sites, female sticklebacks showed also a significant SPG induction ( $p < 0.05$ ) with concentrations of  $159.7 \pm 57.9$  U/kidney and  $111.2 \pm 129.2$  U/kidney respectively.

### 3.3. Somatic index and condition factor

HSI, GSI and CF of stickleback from the different locations are shown in table 5. As for biochemical biomarkers, somatic index and condition factor variations were compared to data from VDV that can be considered as a reference site. No gender effect was recorded for these parameters. HSI calculated for fish from REV, ESC, RHO and VIL were higher compared to other locations but, fish sampled at REV and RHO showed a strong increase of this index. GSI measured in fish from REV and VIL appeared as increased compared to VDV. Conversely, fish collected at LEZ exhibited a low value of GSI. CF was increased in fish from ESC, RHO and VIL. No significant difference was recorded in other investigated sites (i.e. REV, LEZ and VDF).

Table 5

### 3.4. Fish community assessment

FBI calculated at each studied sites and associated fish species strength were presented in table 6. VDV, LEZ, and VIL had a weakly disturbed fish assemblage (i.e. FBI class = 1 or 2) characterised by the presence of sensitive fish species such as eel (*Anguilla anguilla*), trout (*Salmo trutta fario*), Miller's thumb (*Cottus gobio*) and three-spined stickleback. Fish assemblage observed at ESC, RHO and VDF appeared as moderately disturbed (i.e. FBI class = 3) with a few sensitive fish species associated to a dominance of resistant species including roach (*Rutilus rutilus*) and nine-spined stickleback (*Pungitius pungitius*). REV exhibited a very strongly disturbed fish assemblage (i.e. FBI class = 5) with a lack of typical fish species such as the Miller's thumb and the Eurasian

minnow (*Phoxinus phoxinus*) and abundance of parasitic and introduced fish such as the roach and the crucian carp (*Carassius carassius*).

Table 6

#### **4. Discussion**

The present study aimed to determine the usefulness of a set of biomarkers, representing different biological functions in the stickleback, as an early warning system of freshwater contamination. We showed that biochemical biomarkers including biotransformation enzymes (EROD and GST), oxidative stress parameters (GPx, GSH and TBARS), neurotoxicity (AChE) and endocrine disruption indicators (VTG and SPG) showed various response profiles in different streams. For a better site characterisation based on chemical and biological information, these biochemical responses were compared to other end-points classically employed for environmental monitoring such as physico-chemical measurements and fish community assessment, or morphological indexes that are general indicator of fish health.

##### **4.1. Reduction of confounding factor influence**

Many studies reported the influence of various biotic and environmental factors such as age, gender, sampling season and feeding behaviour, on biomarker responses measured in aquatic organisms. In a preliminary investigation of multi-biomarker responses in stickleback sampled in contaminated streams, biotransformation activities, antioxidant defences and morphological indexes appeared as gender-dependent parameters.

Moreover, some biomarkers exhibited a seasonal variability as reported for GST that showed higher levels in Autumn than in Spring (Sanchez et al., 2007). AChE activity has been extensively studied in stickleback (Sturm et al., 1999; Wogram et al., 2001) and, as reported for other fish species, this enzymatic activity is significantly associated with fish length and weight (Sturm et al., 1999). Hence, these confounding factors can

prevent the use of biomarkers for routine environmental monitoring. However, there are many ways that allow reducing variability for a better application of biomarkers in a biomonitoring context. (1) Part of biomarker variability can be explained by the sampling regime itself. This could be reduced by an optimisation of sampling conditions (i.e. sampling during a short period, reduction of fish length range, increase of fish number)(Payne et al., 1996). (2) A better characterisation of confounding factors such as physico-chemical parameters in water and reproductive status of fish, could allow to explain the observed variability and to discriminate responses induced by pollutant exposure and background noise using appropriate statistical analysis (Sturm et al., 1999). (3) Data normalisation could also allow reducing biomarker variability as previously reported for gender differences in EROD activity (Flammarion et al., 1998a). In this work, sampling conditions were optimised to limit the variability due to sampling. For this purpose, fish with a length between 35 and 60 mm, were collected during a four-week period out of their reproductive phase. Hence, compared to the preliminary investigation we performed in sticklebacks sampled in Spring and in Autumn, the biomarker responses in the present study were characterised by a lack of gender difference according to the results previously reported in gudgeon (Faller et al., 2003; Flammarion and Garric, 1997). Moreover, the weight of fish length on AChE activity variations is strongly reduced and length can be ignored for data analysis as indicated in previous study (Payne et al., 1996).

#### **4.2. Selection of reference site**

The need of a reference site for qualitative and quantitative interpretation of wild fish biomarker responses has been reported by several field studies (Balk et al., 1996; Flammarion and Garric, 1997). Conversely to a previous investigation that used

uncontaminated outdoor lotic mesocosms as reference (Sanchez et al., 2007), in the present work, we attempted to define a natural site as a true reference. An a priori approach pointed out three sites (LEZ, VDV and VDF) as candidate of reference status. All the sites were located in the upper area of the streams that were considered as suffering from a mixed environmental pressure (EEA, 2001). Physico-chemical analysis confirmed the lack of important contamination in these stations that exhibited high dissolved oxygen concentration and low conductivity (Table 2). The same conclusion was reached by metal analysis of surface waters, which showed very low or not detectable concentrations of major heavy metals (Table 3). Biomarker response profiles observed in these three sites also exhibited few significant differences, confirming further the low impact level at these locations. More specifically, the biomarker responses showed that fish collected in these three sites were probably not exposed to oxidative stress inducers or endocrine disrupter compounds. Indeed, the values measured in the present work for GPx, GSH and TBARS but also for VTG and SPG levels were consistent with the data reported in sticklebacks collected in uncontaminated outdoor mesocosms (Sanchez et al., 2007) and with the SPG concentrations reported in negative fish caged for three weeks in estuary (Allen et al., 2002). However, one of the investigated biomarkers, the AChE activity showed a significant increase in fish from VDF compared to other sites. This variation however, was below the range of 20% that is recognized as indicative of exposure to neurotoxic compounds (Payne et al., 1996) and could be related to natural variability of this enzyme. The recorded EROD activity showed also interesting trends. Indeed, the activities for LEZ and VDF were not in accordance with the basal levels reported in a previous field study (Sanchez et al., 2007) and could be considered as weakly induced.

This finding was supported by close proximity of the site to an urbanised area and road infrastructures. In line with the in vivo responses, in vitro bioassay using PLHC-1 cell line indicated that sediments from LEZ were contaminated by aryl hydrocarbon receptor agonists (own unpublished data). According to these observations, VDV was selected as reference site to discuss biomarker responses in relation to other more impacted sites. This choice was also supported by the fish responses obtained from VDV, since the general indicators of fish health such as HSI, GSI and CF exhibited values in accordance with reference level reported in sticklebacks before in the scientific literature (Pottinger et al., 2002; Sanchez et al., 2007; Sokolowska et al., 2004).

#### **4.3. Individual effects in contaminated sites**

The usefulness of a set of biochemical biomarkers for aquatic biomonitoring have been reported by several studies (Galloway et al., 2004; Sanchez et al., 2007; Triebkorn et al., 2001). This biological tool provides valuable information in terms of knowledge of exposure to or effects of pollutants in organisms, and places into perspective the data on media contamination and environmental pressures, leading to a better characterisation of aquatic ecosystem quality. In our work, a noteworthy fact was that the biomarker responses patterns noticed in streams under to urban pressure (i.e. REV, ESC and RHO), showed many similarities suggesting that sticklebacks collected in these sites underwent similar sublethal stresses. In all of these sites, the estrogen-dependent yolk precursor VTG was detected in the blood of male sticklebacks. The abnormal synthesis of this protein reflected fish exposure to estrogenic compounds. This result is in accordance with several studies that reported surface water contamination by xenoestrogens such as 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, estrone, 17 $\beta$ -estradiol but also 4-nonylphenol and bisphenol A. The presence of xenoestrogens is usually linked with water bodies that receive mainly



domestic wastewater from sewage treatment works and where VTG induction in collected male fish is evident (Parkkonen et al., 2000; Vethaak et al., 2005). In the same sites, fish were probably exposed to various pollutants able to generate neurotoxic effects and oxidative stress as indicated by AChE inhibition and TBARS increase respectively. Historically, AChE has been described as a biomarker of exposure to organophosphates and carbamates, but several laboratory studies showed that this enzyme can be inhibited by other contaminants such as dioxin-like compounds (Payne et al., 1996). Many of these contaminants are also described as inducers of lipoperoxidation (i.e. TBARS), a parameter described as one of the best biomarkers for biomonitoring, since it reveals oxidative stress-induced damages and not only exposure to pollutants (Van der Oost et al., 2003). In our study, other investigated biomarkers showed different response profiles between sites, consistent with data previously reported for these locations (Sanchez et al., 2007), and which allowed to distinguish the urban contaminated sites. Briefly, responses of GPx and GSH confirmed that sticklebacks were submitted to oxidative stress. GPx was strongly induced at RHO but also at VIL. Similar levels of induction have not been described in the scientific literature before and could reflect the exposure to complex mixtures in the field. Moreover, GSH was depleted in fish from ESC and RHO, two sites characterised by heavy metal contamination. This result is in accordance with the known mode of action of metals reported by laboratory experiments (Sanchez et al., 2005). EROD activity, a recognized biomarker of exposure to dioxin-like compounds (Van der Oost et al., 2003), was also induced in two sites (REV and ESC) located in watershed with high rates of urbanisation and industrialisation, activities recognised to released dioxin-like compounds in the environment. Moreover, to our knowledge, this study is the first field

experiment that reports the induction of androgen-dependent protein SPG in wild stickleback populations. The increases of spiggin content in fish from ESC and RHO suggested that these fish were exposed to androgenic compounds. Surface water contamination by this class of endocrine disrupters is very little documented (Blankvoort et al., 2005; Soto et al., 2004) with the exception of pulp mill effluents that have a well-known masculinising effect (Cody and Bortone, 1997; Denton et al., 1985; Howell and Denton, 1989). Recently, Blankvoort et al. (2005) reported contamination of European rivers by many androgens including testosterone and its metabolites, 17 $\alpha$ -methyltestosterone or trenbolone, that were probably released in aquatic ecosystems by sewage treatment plants and industrial activities, and that could induce spiggin in female sticklebacks.

The biomarker response profile in VIL, a stream subject to an intensive agricultural pressure, appeared as very different compared to the other contaminated sites. Fish were characterised by a strong inhibition of AChE activity combined with an induction of antioxidant defences without lipoperoxidation phenomenon and a decrease of EROD activity. These responses are consistent with the known mode of action of heavy metals, which were not implicated in the alleged profile of VIL's contamination, and pesticides which are extensively used in the VIL watershed area that is released into aquatic ecosystems (Direction de l'Environnement Picardie, unpublished data). Among these pesticides, many substances are known to inhibit AChE activity (Bretaud et al., 2000; Wogram et al., 2001) and/or induce oxidative stress (Kavitha and Venkateswara Rao, 2007) in aquatic organisms whilst organophosphate are also known as catalytic inhibitors of EROD activity (Flammarion et al., 1998b).

The organo-somatic index and CF are integrative indicators that provide valuable information on fish health and reproductive status. These parameters are widely used for freshwater biomonitoring, however, they are considered as weak discriminantors since their responses are influenced by factors other than chemical contamination such as food availability, parasitism and disease. In the contaminated sites investigated here, one or more of these morphological parameters were increased compared to reference site and the basal levels previously described for this species (Pottinger et al., 2002; Sanchez et al., 2007; Sokolowska et al., 2004). Hence, the variations observed for these general indicators could be cautiously linked to biochemical responses. For example, the HSI increase observed, could be linked to implication of liver in VTG synthesis at REV, ESC and RHO and/or to the role of this organ in detoxification process. In a same manner, GSI could be increased follow the exposure to contaminant able to disturb reproductive cycle as previously reported in fish exposed to a variety of endocrine-modulating substances (Orlando et al., 2004). For example, estrogen could be implicated at REV where VTG was induced, however, but other compounds could explain the increase in GSI noticed at VIL where endocrine disruption biomarker were not present. The high CF noticed at ESC, RHO and VIL showed that fish health status was variable between the different. However, CF is a very sensitive parameter responding to biotic and abiotic factors hence, no clear relationship was allowed between chemical contamination and CF variations.

#### **4.4. Relationship between biochemical endpoint and community assessment**

Fish community is considered as a valuable endpoint for integrative stream monitoring because of their position at the top of the trophic food web (Siligato and Bohmer, 2002; Smith et al., 1999). Hence, several biotic indexes based on fish community assessment

have been developed and validated for specific geographical application (Karr, 1981; Kestemont et al., 2000; Oberdorff et al., 2002). In this study, we used the Fish Based Index (FBI) developed by Oberdorff et al. (2002) and adapted to French ichthyofauna, to evaluate fish community disturbances in sampling sites. Among weakly contaminated streams where fish were characterised by low responses to biomarkers, two of them (i.e. LEZ and VDV) exhibited an undisturbed fish assemblage characterised by the presence and abundance of sensitive species (Table 6). Conversely, REV, ESC and RHO sites, that were subjects to various contamination sources and where sticklebacks were clearly affected by water pollution, exhibited moderate to high disturbances of fish assemblage (Table 6). The low quality of fish assemblage in both sites could be explained by water quality alteration but other factors such as habitat modifications or fish species introduction. In both previously described locations, all investigated parameters converged towards the same conclusion indicating the high or the low quality of aquatic ecosystems. In other sites, the conclusions provided by chemical, biochemical and biological indicators differed on certain points. Indeed, VDF fish assemblage was moderately disturbed but this site exhibited good water quality and sticklebacks with low response levels of biomarkers. These observations reflected the lack of perfect relationship between parameters indicating disturbances at various biological organisation levels. Moreover, they confirmed the dependence of biotic index to degradation of the natural habitat by factors other than chemical contamination, such as high predation intensity, fish pathologies or habitat structure modifications (Fischnetz, 2004; Siligato and Bohmer, 2002; Smith et al., 1999). Conversely to VDF, VIL was characterized by a very degraded water quality and fish exhibiting strong biomarker responses even though fish community was weakly impacted. This result shows also the

lack of relationship between biochemical endpoints and population measurements as reported for several other biomarkers (Kloepper-Sams et al., 1994; Roy et al., 2003) and argued for a freshwater monitoring based on multiparametric approach.

## **5. Conclusion**

Several studies have promoted the stickleback as a valuable sentinel for aquatic ecosystem biomonitoring. The present work provided new evidence in favour of the use of the stickleback for this purpose. Indeed, SPG have been extensively used in laboratory to characterise (anti)-androgenicity of chemicals. We showed that measurement of SPG in wild sticklebacks provided evidence to exposure to androgenic contaminants in the environment. In this context, the stickleback appears as an interesting sentinel fish species that can provide additional information on the chemical contamination of ecosystems compared to other species traditionally used for environmental biomonitoring such as chub and roach. The other investigated biomarkers showed various response patterns consistent with environmental pressures and chemical contamination in sampling sites. These biochemical responses provided site-specific profiles that highlighted contamination data and allowed to distinguish sampling locations. However, biomarker responses are little informative to disturbances at higher levels of organisation. Hence, in this study, we assessed fish community parameters that reflect integrated conditions over a long time period and are more ecologically relevant. We reported population disturbances in several sampling sites, induced by chemical contamination and/or other various factors, but we also noticed a lack of clear relationship between biomarker variations and population responses. Also, this study argued for a multi-parametric approach of aquatic ecosystem contamination based on association between chemical, biochemical and population endpoints. As

observed in the present field study, this kind of experiment generates large data sets making their interpretation by environmental managers in order to evaluate freshwater quality an onerous task. Hence, further studies are needed and are in progress to with the aim of developing and validating a specific ecological indicator that allows stream classification based on biomarker responses.

## **Acknowledgements**

We thank the official fishguards from the “Office National de l’Eau et des Milieux Aquatiques” for the technical assistance in fish sampling. We thank also K. Tack and L. Meunier from environmental chemistry unit of INERIS for metal analysis in surface water. This work was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de la Recherche et du Développement AP-2004).

## **References**

- Allen, Y.; Balaam, J.; Bamber, S.; Bates, H.; Best, G.; Begnell, J.; Brown, E.; Craft, J.; Davies, J.M.; Depledge, M.H.; Dyer, R.A.; Feist, S.; Hurst, M.R.; Hutchinson, T.H.; Jones, G.; Jones, M.B.; Katsiadaki, I.; Kirby, M.F.; Leah, R.; Matthiessen, P.; Megginson, C.; Moffat, C.F.; Moore, A.; Pirie, D.; Robertson, F.; Robinson, C.D.; Scott, A.P.; Simpson, M.G.; Smith, A.; Stagg, R.M.; Struthers, S.; Thain, J.E.; Thomas, K.V.; Tolhurst, L.; Waldock, M.J.; Walker, P. Final report : Endocrine Disruption in the Marine Environment (EDMAR); 2002.
- Amiard, J.C.; Caquet, T.; Lagadic, L. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In: Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C.; Ramade, F. (Eds.), Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, Londres, Paris, New York, pp. XXI-XXXI; 1998.

Balk, L.; Larsson, A.; Forlin, L. Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances. *Mar. Environ Res.* 42: 203-208; 1996.

Blankvoort, B.M.G.; Rodenburg, R.J.T.; Murk, A.J.; Koeman, J.H.; Schilt, R.; Aarts, J.M.M.J.G. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. *Environ Toxicol Pharmacol.* 19: 263-272; 2005.

Bradford, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254; 1976.

Brethead, S.; Toutant, J.-P.; Saglio, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 47: 117-124; 2000.

Carle, F.L.; Strub, M.R. A new method for estimating population size from removal data. *Biometrics.* 34: 621-630; 1978.

Cody, R.P.; Bortone, S.A. Masculinization of mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull Environ Contam Toxicol.* 58: 429-436; 1997.

Denton, T.E.; Howell, W.M.; McCollum, C.J.; Marks, E.B.; Allison, J.J. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 35: 627-632; 1985.

EEA (European Environmental Agency). Reporting river quality using the Water Quality Accounts methodology. Application within the Eurowaternet process, Copenhagen; 2001.

Faller, P.; Kobler, B.; Peter, A.; Sumpter, J.P.; Burkhardt-Holm, P. Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environ Toxicol Chem.* 22: 2063-2072; 2003.

Fischnetz. Sur la trace du déclin piscicole. Rapport final. Dübendorf, Bern : EAWAG/OFEFP; 2004.

Flammarion, P.; Garric, J. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere.* 35: 2375-2388; 1997.

Flammarion, P.; Migeon, B.; Garric, J. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40: 144-153; 1998a.

Flammarion, P.; Noury, P.; Garric, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environ Poll.* 120: 325-330; 2002a.

Flammarion, P.; Migeon, B.; Urios, S.; Morfin, P.; Garric, J. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat Toxicol.* 42: 93-102; 1998b.

Flammarion, P.; Devaux, A.; Nehls, S.; Migeon, B.; Noury, P.; Garric, J. Multibiomarker responses in fish from the Moselle river (France). *Ecotoxicol Environ Saf.* 51: 145-153; 2002b.

Galloway, T.S.; Brown, R.J.; Browne, M.A.; Dissanayake, A.; Lowe, D.; Jones, M.B.; Depledge, M.H. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ Sci Technol.* 38: 1723-1731; 2004.



Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249: 7130-7139; 1974.

Handy, R.D.; Runnalls, T.; Russel, P.M. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology.* 11: 467-479; 2002.

Holm, G.; Lundström, J.; Andersson, T.; Norrgren, L. Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the thre-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol.* 29: 241-256; 1994.

Howell, W.M.; Denton, T.E. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environ Biol Fish.* 24: 43-51; 1989.

Huet, M. Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweiz Z Hydrol.* 11: 332-351; 1949.

Jakobsson, S.; Borg, B.; Haux, C.; Hyllner, S.J. An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Physiol Biochem.* 20: 79-85; 1999.

Karr, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries.* 6: 21-27; 1981.

Katsiadaki, I.; Scott, A.P.; Mayer, I. The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Mar Environ Res.* 54: 725-728; 2002a.

Katsiadaki, I.; Scott, A.P.; Hurst, M.R.; Matthiessen, P.; Mayer, I. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent

assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem* 21: 1946-1954; 2002b.

Katsiadaki, I.; Morris, S.; Squires, C.; Hurst, M.R.; James, J.D.; Scott, A.P. A sensitive, in vivo test for the detection of environmental anti-androgens, using the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ Health Persp.* 114: 115-121; 2006.

Kavitha, P.; Venkateswara Rao, J. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pest Biochem Physiol.* 87: 182-188; 2007.

Kestemont, P.; Didier, J.; Depiereux, E.; Micha, J.-C. Selecting ichthyological metrics to assess river quality basin ecological quality. *Arch Hydrobiol. Suppl.* 121: 321-348; 2000.

Kloepper-Sams, P.M.; Swanson, S.M.; Marchant, T.; Schryer, R.; Owens, J.W. Exposure of fish to biologically treated bleached-kraft effluent. 1. Biochemical, physiological and pathological assessment of rocky mountain whitefish (*Prosopium williamsi*) and longnose sucker (*Catostomus catostomus*). *Environ Toxicol Chem.* 13: 1469-1482; 1994.

Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C., Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In: Lagadic, L.; Caquet, T.; Amiard, J.C.; Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York; 1997.

Oberdorff, T.; Pont, D.; Hugueny, B.; Belliard, J.; Berrebi Dit Thomas, R.; Porcher, J.P. Adaptation et validation d'un indice poisson (FBI) pour l'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau français. *Bull Fr Pêche Piscic.* 365/366: 405-433; 2002.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358; 1979.

Orlando, E.F.; Kolok, A.S.; Binzcik, G.A.; Gates, J.L.; Horton, M.K.; Lambright, C.S. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow. *Environ Health Persp.* 112: 353-358; 2004.

Paglia, D.E.; Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70: 158-169;. 1967.

Parkkonen, J.; Larsson, D.G.J.; Adolfsson-Erici, M.; Pettersson, M.; Berg, A.H.; Olsson, P.-E.; Forlin, L. Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish. *Mar Environ Res.* 50: 198; 2000.

Payne, J.F.; Mathieu, A.; Melvin, W.; Fancey, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Poll Bull.* 32: 225-231; 1996.

Pottinger, T.G.; Carrick, T.R.; Yeomans, W.E. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *J Fish Biol.* 61: 207-229; 2002.

Prygiel, J. Management of the diatom monitoring networks in France in 2000. *J Appl Phycol.* 14: 19-26; 2002.

Prygiel, J.; Rosso-darmet, A.; Lafont, M.; Lesniak, C.; Durbec, A.; Ouddane, B. Use of Oligochaete communities for assessment of ecotoxicological risk in fine sediments of rivers and canals of the Artois-Picardie water basin (France). *Hydrobiologia.* 410: 25-37; 1999.

Roy, L.; Armstrong, J.; Sakamoto, K.; Steinert, S.; Perkins, E.; Lomax, D.; Johnson, L.; Schlenk, D. The relationships of biochemical endpoints to histopathology and population metrics in feral flatfish species collected near the municipal wastewater outfall of Orange County, California, USA. *Environ Toxicol Chem.* 22: 1309-1317; 2003.

Sanchez, W.; Palluel, O.; Lagadic, L.; Aït-Aïssa, S.; Porcher, J.-M. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Mar Environ Res.* 62: S29-S33; 2006.

Sanchez, W.; Aït-Aïssa, S.; Palluel, O.; Ditché, J.M.; Porcher, J.M. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology.* 16: 279-287; 2007.

Sanchez, W.; Palluel, O.; Meunier, L.; Coquery, M.; Porcher, J.-M.; Aït-Aïssa, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol.* 19: 177-183; 2005.

Schmitt, C.J.; Ellen Hinck, J.; Blazer, V.S.; Denslow, N.D.; Dethloff, G.M.; Bartish, T.M.; Coyle, J.J.; Tillitt, D.E. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Rio Grande and its U.S. tributaries: Spatial and temporal trends. *Sci Total Environ.* 350: 161-193; 2005.

Sebire, M.; Katsiadaki, I.; Scott, A.P. Non-invasive measurement of 11-ketotestosterone, cortisol and androstenedione in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Gen Comp Endocrinol.* 152: 30-38; 2007.

Siligato, S.; Bohmer, J. Evaluation of biological integrity of a small urban stream system by investigating longitudinal variability of the fish assemblage. *Chemosphere*. 47: 777-788; 2002.

Smith, A.K.; Ajani, P.A.; Roberts, D.E. Spatial and temporal variation in fish assemblages exposed to sewage and implications for management. *Mar Environ Res*. 47: 241-260; 1999.

Sokolowska, E.; Kalamarz, H.; Kulczykowska, E. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comp Biochem Physiol Part A*. 139: 365-369; 2004.

Soto, A.M.; Calabro, J.M.; Prechtl, N.V.; Yau, A.Y.; Orlando, E.F.; Daxenberger, A.; Kolok, A.S.; Guillette, L.J., Jr.; le Bizec, B.; Lange, I.G.; Sonnenschein, C. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving Cattle Feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environ Health Persp*. 112: 346-352; 2004.

Strahler, A.N. Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Trans Am Geophys Union*. 38: 913-920; 1957.

Sturm, A.; Wogram, J.; Hansen, P.D.; Liess, M. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ Toxicol Chem*. 18: 194-200; 1999.

Sturm, A.; Wogram, J.; Segner, H.; Liess, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Environ Toxicol Chem*. 19: 1607-1615; 2000.

Triebskorn, R.; Böhmer, J.; Braunbeck, T.; Honnen, W.; Köhler, H.-R.; Lehmann, R.; Oberemm, A.; Schwaiger, J.; Segner, H.; Schüürmann, G.; Traunspurger, W. The project VALIMAR (VALIdation of bioMARkers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery*. 8: 161-178; 2001.

Van der Oost, R.; Beyerb, J.; Vermeulen, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149; 2003.

Vandeputte, C.; Guizon, I.; Genestie-Denis, I.; Vannier, B.; Lorenzon, G. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 10: 415-421; 1994.

Vethaak, A.D.; Lahr, J.; Schrap, S.M.; Belfroid, A.C.; Rijs, G.B.J.; Gerritsen, A.; de Boer, J.; Bulder, A.S.; Grinwis, G.C.M.; Kuiper, R.V. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*. 59: 511-524; 2005.

Wasson, J.G.; Chandesris, A.; Pela, H.; Blanc, L. Les hydro-écorégions de France métropolitaine. Approche régionale de la typologie des eaux courantes et éléments pour la définition des peuplements de référence d'invertébrés. Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, Cemagref BEA/LHQ.; 2002.

Wogram, J.; Sturm, A.; Segner, H.; Liess, M. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short term exposure. *Environ Toxicol Chem*. 20: 1528-1531; 2001.

